



Spectroscopie RMN du ^1H pondérée en diffusion, du ^{13}C et du ^{17}O : développements méthodologiques pour l'étude de la structure et de la fonction cellulaire in vivo

Chloé Najac

► To cite this version:

Chloé Najac. Spectroscopie RMN du ^1H pondérée en diffusion, du ^{13}C et du ^{17}O : développements méthodologiques pour l'étude de la structure et de la fonction cellulaire in vivo. Physique Médicale [physics.med-ph]. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT : 2014PA112242 . tel-01126906

HAL Id: tel-01126906

<https://theses.hal.science/tel-01126906>

Submitted on 6 Mar 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARIS SUD XI

ECOLE DOCTORALE : Sciences et Technologies de l'Information des
Télécommunications et des Systèmes

LABORATOIRE: Laboratoire des Maladies Neurodégénératives, MIRCent, CEA

DISCIPLINE : Physique

THESE DE DOCTORAT

Soutenue le **26 Septembre 2014** par

Chloé NAJAC

**Spectroscopie RMN du ^1H pondérée en diffusion, du ^{13}C
et du ^{17}O : développements méthodologiques pour
l'étude de la structure et de la fonction cellulaire *in vivo***

Composition du jury :

Directeur de thèse :	Vincent LEBON	Chercheur, MIRCent, CEA
Responsable du travail de thèse :	Julien VALETTE	Chercheur, MIRCent, CEA
Rapporteurs :	Jean-Michel FRANCONI Stefan POSSE	Prof., Univ. Bordeaux 2 Prof., Univ. Albuquerque
Examineurs :	Marie POIRIER-QUINOT Itamar RONEN	MCF, Univ. Paris-Sud XI Prof., Univ. Leiden

REMERCIEMENTS

Au cours de ces trois dernières années, j'ai eu le plaisir et le privilège de réaliser ma thèse dans un environnement scientifique et humain particulièrement stimulant et riche en enseignements. Je tiens donc à remercier les personnes qui ont largement contribué à l'aboutissement de ce travail de thèse, elles m'ont permis de vivre une très belle aventure.

Je remercie Philippe Hantraye de m'avoir accueillie à MIRCen et Emmanuel Brouillet de m'avoir reçue au sein du Laboratoire des Maladies Neurodégénératives (URA CEA CNRS 2210). Je les remercie de m'avoir permis de profiter de moyens considérables pour mener à bien mes travaux de recherche.

Un très grand merci à Julien Valette pour son encadrement et les nombreux enseignements dont j'ai pu bénéficier pendant ces trois ans (et demi !). Sa présence quotidienne, son aide précieuse et ses encouragements m'ont permis de réaliser ma thèse dans d'excellentes conditions. Je tiens également à le remercier pour sa confiance et son indulgence. J'espère avoir à nouveau l'opportunité de travailler avec lui.

Je remercie Vincent Lebon d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse et pour son soutien. Je lui suis très reconnaissante pour sa relecture attentive de mon manuscrit et ses remarques judicieuses qui m'ont permis de rectifier et améliorer le texte.

Je remercie également Jean-Michel Franconi, Stefan Posse, Marie Poirier-Quinot et Itamar Ronen pour leur participation à mon jury de thèse et pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail.

Merci à Martine Guillermier et Diane Houitte d'avoir partagé avec moi leur savoir-faire et leurs compétences en expérimentation animale (et bien d'autres !). Merci pour leurs encouragements, leur aide et leur patience.

Sans les RMNistes MIRCenniens, ce travail n'aurait pas été le même. Merci à Brice Tiret pour son aide lors des manipes oxygène-17, ses lumières sur Matlab, ses mails très instructifs et sa bonne humeur. Merci à Charlotte Marchadour, mon binôme pour les travaux en spectroscopie pondérée en diffusion pendant deux ans et demi, pour tous les bons souvenirs à MIRCen et en dehors. Merci à Clémence Ligneul, qui commence sa thèse, pour sa gentillesse, ses encouragements et ses corrections orthographiques du manuscrit (entre autres !). Merci à Julien

Flament pour son aide et ses idées incroyables qui ont permis la mise en œuvre du système de ventilation oxygène-17. Je souhaite une longue vie au CEST ! Merci à Marco Palombo d'avoir partagé avec moi ses connaissances sur les inhomogénéités de susceptibilité magnétique et de rendre la modélisation des cellules beaucoup plus réaliste !

Merci aux membres actuels et passés de la Team 1 : Gilles Bonvento, Emmanuel Brouillet, Carole Escartin, Laetitia Francelle, Lucile Ben Haim, Emilie Faivre, Juliette Le Douce, Aurélie Berniard, Kelly Ceyzeriat, Maria Carillo-de Sauvage... pour les nombreuses discussions, et notamment pour leurs conseils avisés sur mon travail et leurs enseignements sur les maladies neurodégénératives, les relations neurones-astrocytes, la morphologie cellulaire...

Une partie de ce travail de thèse a été possible grâce à la collaboration de Francesca Branzoli et Itamar Ronen du Leiden University Medical Center (LUMC) aux Pays-Bas. Je les remercie de m'avoir ouvert les portes de leur laboratoire et pour leur aide.

Merci à Didier Thenadey, le « superman » de l'informatique à MIRCen.

Merci à Marie-Christine Courbeix et Marie-Laure Manenti pour leur aide dans les démarches administratives.

Merci à mes chers collègues du Bureau 110 pour leur bonne humeur, leur gentillesse et leur soutien dans les moments de découragements. Merci à Brice, Cécile, Charlotte G., Charlotte M., Chrystelle, Clémence, Kelly, Matthias, Marco, Nad, Nelly, Niels, Olène...

Pour les discussions pendant les pauses café/déjeuner, dans l'ascenseur ou le RER, les apéros du vendredi soir, pour les soirées pendant l'ISMRM : merci à Alfredo, Audrey, Aurélie, Benjamin, Benoît, Caroline, Charlène, Charlotte G., Charlotte M., Clémence, Diane, Dimitri, Elsa, Emilie, Fanny, Francesca, Gwenn, Ileana, Jessica, Julien F., Julien V., Juliette, Karine, Kelly, Laetitia, Léopold, Lucile, Maria, Marie, Marie-Anne, Marie-Claude, Martine, Matthias, Marco, Mickaël, Mylène, Nad, Nadja, Noëlle, Noémie, Olivier, Pauline, Romain, Romina, Séverine, Susannah, Yann... Un grand merci à Coline, Marie et Sarah pour leur amitié et pour les nombreux moments partagés ensemble à Toulouse, Grenoble et Paris !

Pour finir, je souhaite profondément remercier mes parents, mes sœurs Kim et Marion, et mes grands-parents pour leur soutien, leur générosité et leur confiance. Un immense merci pour tous leurs encouragements et leur aide.

TABLE DES MATIERES

Abréviations et notations	7
Introduction générale.....	11
Partie 1: Etude de la structure des neurones et des astrocytes par Spectroscopie RMN du ^1H pondérée en diffusion.....	15
Chapitre 1 : Mesure de la diffusion par RMN : de la diffusion libre à la diffusion dans le milieu biologique.....	17
1.1. La diffusion brownienne	17
1.1.1. Le coefficient de diffusion.....	17
1.1.2. La théorie du mouvement brownien	18
1.2. Mesure de la diffusion libre par RMN	19
1.2.1. Mesure de D avec l'approximation des gradients de diffusion très courts	19
1.2.2. Mesure de D dans le cas général.....	21
1.2.3. Prise en compte des termes croisés	23
1.2.4. Apport de la RMN pour la mesure de la diffusion	23
1.3. Mesure de la diffusion dans le milieu biologique par RMN.....	24
1.3.1. Description du milieu biologique	24
1.3.2. La diffusion est restreinte et tortueuse	25
1.3.3. La diffusion est assistée.....	26
1.3.4. Mesure de l'ADC par RMN	29
1.4. Applications et tendance actuelle.....	32
Chapitre 2 : Potentiel de la spectroscopie RMN pondérée en diffusion pour caractériser l'organisation intracellulaire	35
2.1. Détermination de la méthode optimale pour caractériser la géométrie intracellulaire	36
2.1.1. Modèles analytiques de l'architecture cellulaire.....	36
2.1.2. Simulations sur Matlab pour déterminer la contribution des paramètres intracellulaires à la mesure de l'ADC	39
2.1.3. Résultats et discussion.....	39
2.2. Connaissances actuelles sur la dépendance de l'ADC au temps de diffusion	41
2.2.1. Mesure aux temps de diffusion courts	41
2.2.2. Mesure aux temps de diffusion longs	42
2.3. Conclusion	43

Chapitre 3 : Etude de la compartimentation des métabolites dans les neurones et les astrocytes	45
3.1. Séquence pour la diffusion aux temps longs	45
3.1.1. Schéma de la séquence	45
3.1.2. Coefficient de pondération en diffusion et correction des termes croisés.....	47
3.1.3. Validation <i>in vitro</i>	48
3.2. Mesure de l'ADC <i>in vivo</i>	49
3.2.1. Protocole expérimental	49
3.2.2. Traitement des données.....	50
3.2.3. Résultats.....	51
3.2.4. Discussion.....	52
3.3. Modélisation des données <i>in vivo</i>	54
3.3.1. Simplification du modèle des « neurites ».....	54
3.3.2. Ajustement des données	55
3.3.3. Résultats de la modélisation.....	55
3.3.4. Discussion.....	57
3.4. Conclusion	59
 Chapitre 4 : Etude de la diffusion des métabolites dans la substance grise et la substance blanche	 61
4.1. Spectroscopie du tenseur de diffusion	61
4.2. Mesure de l'ADC _{trace} <i>in vivo</i>	62
4.2.1. Protocole expérimental	62
4.2.2. Traitement des données.....	63
4.2.3. Résultats.....	65
4.3. Discussion.....	68
4.4. Conclusion	72
 Chapitre 5 : Etude de la différence entre les métabolites neuronaux et astrocytaires	 73
5.1. Mesure de l'ADC <i>in vivo</i> jusqu'à 2 secondes.....	73
5.1.1. Protocole expérimental	73
5.1.2. Traitement des données.....	74
5.1.3. Résultats et discussion.....	74
5.2. Modélisation des données expérimentales	76
5.2.1. Description du modèle.....	76
5.2.2. Validation du modèle par simulations	76
5.2.3. Ajustement des données expérimentales.....	77
5.2.4. Résultats.....	78
5.2.5. Discussion.....	80
5.3. Conclusion	80
 Chapitre 6 : Contamination potentielle des termes croisés avec des gradients variables aux temps longs.....	 81
6.1. Théorie : termes croisés avec des gradients variables.....	81
6.1.1. Contribution des termes croisés.....	83
6.1.2. Le coefficient « magique » introduit par Galvosas et al.	86

6.2. Application de la séquence MAG-STEAM localisée <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	88
6.2.1. Séquence MAG-STEAM localisée	89
6.2.2. Validation de la séquence MAG-STEAM <i>in vitro</i>	91
6.2.3. Comparaison des séquence STEAM et MAG-STEAM <i>in vivo</i> à 11.7 T.....	93
6.3. Conclusion	95
Chapitre 7 : Conclusion et perspectives	99
Partie 2: Etude du métabolisme énergétique par Spectroscopie RMN du ^{13}C et du ^{17}O.....	105
Chapitre 8 : Métabolisme énergétique et Spectroscopie par Résonance Magnétique des noyaux X.....	107
8.1. Introduction au métabolisme énergétique cérébral	107
8.1.1. La glycolyse.....	108
8.1.2. Le cycle de Krebs	109
8.1.3. La phosphorylation oxydative	110
8.1.4. Bilan de la respiration cellulaire.....	111
8.2. Spectroscopie RMN des noyaux X : mesure des flux métaboliques	112
8.2.1. La spectroscopie du ^{13}C	113
8.2.2. La spectroscopie du ^{17}O	113
8.3. Conclusion	118
Chapitre 9 : Mise en œuvre de la spectroscopie du ^{13}C à 7 T.....	119
9.1. Spectroscopie du ^{13}C en détection indirecte.....	119
9.1.1. Protocole expérimental	120
9.1.2. Résultats.....	122
9.1.3. Discussion.....	123
9.2. Spectroscopie du ^{13}C en détection directe.....	125
9.2.1. La séquence 3D ISIS-DEPT	125
9.2.2. Validation de la séquence <i>in vitro</i>	127
9.2.3. Limitations rencontrées <i>in vivo</i>	129
9.3. Conclusion	129
Chapitre 10 : Développement de la spectroscopie du ^{17}O à 7 T	131
10.1. Développements matériels et méthodologiques	131
10.1.1. Système de ventilation.....	131
10.1.2. Imagerie spectroscopique du ^{17}O	133
10.1.3. Modèle analytique pour la mesure de CMRO_2	135
10.2. Mesure de CMRO_2 <i>in vivo</i>	137
10.2.1. Protocole expérimental et traitement des données.....	137
10.2.2. Variation du signal H_2^{17}O	138
10.2.3. Modélisation des données : mesure de CMRO_2	140
10.2.4. Discussion.....	141
10.3. Conclusion	144
Chapitre 11 : Conclusion et perspectives	145

Conclusion générale	147
Bibliographie	149
Annexe	167
Liste des publications et communications scientifiques.....	169

ABREVIATIONS ET NOTATIONS

^1H	Proton
^{13}C	Carbone 13
^{15}O	Oxygène 15
^{17}O	Oxygène 17
^{31}P	Phosphore 31
3-NP	Acide 3-nitropropionique
ADC	Coefficient de diffusion apparent
$\text{ADC}_{\text{trace}}$	Trace du tenseur de diffusion divisé par 3
AHP	Adiabatic half passage
α	Fraction d'enrichissement en ^{17}O
Asp	Aspartate
ADP	Adénosine diphosphate
ATP	Adénosine triphosphate
b	Coefficient de pondération en diffusion
B_0	Champ magnétique statique
B_1	Champ magnétique variable
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BIR	B_1 insensitive rotation
CEA	Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives
Cho	Choline
CMRO_2	Consommation cérébrale en oxygène
CNRS	Centre national de recherche scientifique
Cr	Créatine
CRLB	Cramér-Rao Lower Bound
CSI	Chemical shift imaging
D	Coefficient de diffusion libre
D_{eff}	Coefficient de diffusion effectif
Δ	Délai entre les deux gradients de diffusion
δ	Durée d'application des gradients de diffusion

DEPT	Distortionless enhancement by polarisation transfer
D_{intra}	Coefficient de diffusion intracellulaire
FAD, FADH ₂	Flavine adénine dinucléotide
FASTMAP	Fast automatic shimming technique by mapping along projections
FID	Free induction decay
G	Gradient de champ magnétique
GABA	Acide γ -aminobutyrique
γ	Rapport gyromagnétique
Glc	Glucose
Gln	Glutamine
GPC	Glycérophosphocholine
INEPT	Insensitive nucleus enhancement by polarisation transfer
Ins	Myo-inositol
IRM	Imagerie par résonance magnétique
ISIS	Image selected <i>in vivo</i> spectroscopy
J	Constante de couplage dipolaire
LCR	Liquide céphalo-raphidien
LMN	Laboratoire des Maladies Neurodégénératives
MAGSTE	Séquence d'écho stimulé pondérée en diffusion avec le ratio « magique »
MAGSTEAM	Séquence STEAM pondérée en diffusion avec le « ratio magique »
MH	Maladie de Huntington
MIR Cen	Molecular Imaging Research Center
MM	Macromolécules
NAA	Acide N-acétyl-aspartate
NAAG	Acide N-acétyl-aspartylglutamique
NAD ⁺ , NADH	Nicotinamide dinucléotide
ν	Fréquence de résonance
OVS	Outer Volume Suppression
P/O	Nombre de mole d'ATP produit par mole d'oxygène réduit
PC	Pyruvate carboxylase
PCho	Phosphorylcholine
PCr	Phosphocréatine
PDH	Pyruvate déshydrogénase
Pi	Phosphate inorganique
POCE	Proton observed carbon edited
PRESS	Point resolved spectroscopy

RMN	Résonance magnétique nucléaire
SB	Substance blanche
SENSE	Sensitivity encoding
SG	Substance grise
SHFJ	Service Hospitalier Frédéric Joliot
SNR	Signal-sur-bruit
SS-SQ-DOSY	Single state single quantum diffusion ordered spectroscopy
STEAM	Stimulated echo acquisition mode
T_1	Temps de relaxation longitudinale
T_2	Temps de relaxation transversale
TCA	Cycle tricarboxylique
tCho	Choline totale (=Cho+PCho+GPC)
tCr	Créatine totale (=Cr+PCr)
t_d	Temps de diffusion
TE	Temps d'écho
TI	Temps d'inversion
TM	Temps de mélange
tNAA	N-acétyl-aspartate total (=NAA+NAAG)
TR	Temps de répétition
TS	Singlet lifetime
URA	Unité de recherche associée
VAPOR	Variable power RF pulses with optimized delays
V_{TCA}	Vitesse du cycle de Krebs

INTRODUCTION GENERALE

La cellule est l'unité structurale et fonctionnelle à la base de tous les organismes vivants. Dans le cerveau, on distingue les neurones et les cellules gliales (astrocytes, microglie, oligodendrocytes). Dans de nombreuses maladies neurodégénératives (maladie de Huntington ou maladie de Alzheimer), des altérations majeures de la structure (agrégats au niveau intracellulaire, activation astrocytaire, atrophie neuronale) et de la fonction de ces cellules (baisse du métabolisme énergétique) sont observées (Beal, 1992 ; Arrasate and Finkbeiner, 2012 ; Meraz-Rios et al., 2013). Les progrès méthodologiques et technologiques des dernières décennies ont permis des avancées majeures dans la compréhension des mécanismes cellulaires et la recherche de bio-marqueurs. En particulier, l'imagerie par Résonance Magnétique (IRM) et la spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) permettent d'obtenir des informations anatomiques, structurales et fonctionnelles de manière non invasive et non ionisante.

La spectroscopie RMN utilise les propriétés magnétiques de certains noyaux pour détecter les molécules d'eau et les métabolites dans le cerveau. Bien que le ^1H soit le noyau le plus couramment étudié, d'autres noyaux (dits *noyaux X*) présentent aussi un grand intérêt (^{13}C , ^{31}P , ^{19}F , ^{17}O ...). En recherche préclinique, le développement de nouvelles séquences, d'aimants à hauts champs, de gradients de plus grandes intensités et de nouvelles techniques de traitement d'images permet d'élargir le champ d'application de la spectroscopie RMN. Différents paramètres sont observés : la concentration des différents métabolites, les flux métaboliques (par exemple la vitesse de synthèse de l'adénosine triphosphate ou ATP, principale source d'énergie dans les cellules, Lei et al., 2003a), ou encore des paramètres dynamiques (le coefficient de diffusion des métabolites et de l'eau, Nicolay et al., 2001) ou d'équilibre (mesure du pH, Chaumeil et al., 2012). De plus, la spécificité cellulaire de certains métabolites (par exemple le N-acétyl-aspartate est un marqueur neuronal tandis que la choline est majoritairement localisée dans les astrocytes) permet d'obtenir des informations hautement spécifiques sur les neurones et les astrocytes séparément (Brand et al., 1993 ; Urenjak et al., 1993 ; Choi et al., 2007). Le volume de détection contient un très grand nombre de neurones et de cellules gliales. La mesure est alors à l'échelle macroscopique et représente une moyenne de

ce large ensemble de cellules. Des défis méthodologiques fondamentaux restent encore à relever pour comprendre et expliquer les résultats obtenus et espérer étendre cette technique en clinique, où son utilisation reste encore très limitée.

Cette thèse a été réalisée au Laboratoire des Maladies Neurodégénératives (LMN, CEA CNRS URA 2210) rattaché à MIRCen (Molecular Imaging Research Center) au Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives (CEA) à Fontenay-aux-Roses. Le LMN est un laboratoire de recherche préclinique spécialisé dans le développement de modèles animaux et l'évaluation de thérapies dans le contexte des maladies neurodégénératives (Parkinson, Huntington, Alzheimer). La plateforme d'imagerie par résonance magnétique dispose d'un IRM 7 T Agilent (Palo Alto, CA, USA) équipé d'un gradient dédié à l'étude des primates non humains et d'un insert de gradients pour l'étude des rongeurs (rat, souris, microcèbe) et depuis décembre 2013, d'un nouvel IRM 11.7 T Bruker (Bruker Biospin, Ettlingen, Allemagne) dédié uniquement aux études chez le rongeur. L'équipe de spectroscopie RMN développe de nouvelles approches (spectroscopie du ^1H , ^{13}C , ^{31}P et ^{17}O) pour explorer la structure et la fonction cellulaire *in vivo* en condition physiologique et pathologique.

Dans ce contexte, l'objectif général de cette thèse a été de développer et d'implémenter trois techniques de spectroscopie RMN : la spectroscopie RMN du ^1H pondérée en diffusion, la spectroscopie du ^{13}C et la spectroscopie du ^{17}O .

Ce manuscrit est divisé en deux parties. Les principes physiques de la RMN ne sont pas détaillés. Pour les lecteurs peu familiers, nous recommandons la lecture du livre « *In vivo* NMR spectroscopy : principes and techniques » de Robin A. de Graaf (de Graaf, 1998). Néanmoins, les principes de base des techniques utilisées sont développés au début de chaque partie.

Dans la première partie de ce manuscrit, les travaux réalisés en spectroscopie RMN du ^1H pondérée en diffusion sont présentés. Tout d'abord, les principes généraux de cette technique sont introduits (chapitre 1). Ensuite, la stratégie choisie (ici l'étude de la dépendance du coefficient de diffusion apparent (ADC) au temps de diffusion t_d) pour étudier la compartimentation des métabolites intracellulaires et la structure des cellules (neurones et astrocytes) est décrite (chapitre 2). Dans les chapitres suivants, notre approche est appliquée *in vivo*. L'ADC des métabolites est mesuré dans le cerveau de macaques sains dans un large voxel contenant un mélange de substance blanche (SB) et de substance grise (SG) (chapitre 3) puis dans le cerveau de l'Homme dans deux voxels contenant majoritairement de la SB ou de la SG (chapitre 4). Suite aux résultats obtenus, une dernière étude a été menée chez le macaque dans le but de différencier les métabolites neuronaux et astrocytaires (chapitre 5). Enfin, les

limitations liées à l'utilisation d'une séquence pondérée en diffusion classique aux temps de diffusion très longs sont abordées (chapitre 6).

Dans la deuxième partie, les différents développements méthodologiques réalisés sur l'IRM 7 T pour l'étude du métabolisme énergétique cellulaire sont détaillés. Après une brève introduction sur la respiration cellulaire (dégradation du glucose et synthèse de l'ATP), la spectroscopie RMN du ^{13}C et la spectroscopie RMN du ^{17}O sont présentées (chapitre 8). Ensuite, les développements méthodologiques (détection indirecte puis directe) pour mesurer la vitesse du cycle de Krebs (V_{TCA}) par spectroscopie du ^{13}C et les limitations rencontrées à 7 T (analyse des données et puissance émise pour le découplage hétéronucléaire) sont exposés (chapitre 9). Enfin, la spectroscopie RMN du ^{17}O , permettant de mesurer la vitesse de consommation de l'oxygène au cours de la phosphorylation oxydative ($CMRO_2$), est présentée comme une solution alternative (chapitre 10).

A la fin du manuscrit, une liste des communications et des articles (publiés ou en cours de révision) est fournie.

PARTIE 1

ETUDE DE LA STRUCTURE DES NEURONES ET DES ASTROCYTES PAR SPECTROSCOPIE RMN DU ^1H PONDEREE EN DIFFUSION

MESURE DE LA DIFFUSION PAR RMN : DE LA DIFFUSION LIBRE A LA DIFFUSION DANS LE MILIEU BIOLOGIQUE

1.1. La diffusion brownienne

Dans un milieu fluide (liquide ou gaz), libre (sans obstacle) et homogène contenant un ensemble de molécules, la diffusion de chaque molécule résulte d'un mouvement aléatoire induit par un transfert d'énergie associé aux nombreuses collisions successives avec les autres molécules du solvant (agitation thermique). On parle de diffusion brownienne du nom du botaniste Robert Brown qui observa en 1827 que des particules de pollen, dispersées dans un milieu liquide, se déplacent de manière aléatoire, incessante et non prévisible. En 1855, Adolph Fick propose des lois phénoménologiques pour expliquer la théorie du mouvement brownien. Albert Einstein, en 1905, démontre quantitativement les lois de Fick. Trois ans plus tard, Jean Baptiste Perrin mesure la trajectoire de particules soumises au mouvement brownien et vérifie ainsi l'analyse théorique d'Einstein.

1.1.1. Le coefficient de diffusion

Dans un milieu fluide où les molécules sont faiblement concentrées, l'équation de Stokes-Einstein permet d'introduire le coefficient de diffusion libre D qui dépend de la température du fluide T , de la constante de Boltzmann k_B et du coefficient de friction f :

$$D = \frac{k_B T}{f} \quad (1.1)$$

D'après la loi de Stokes, la force de frottement qui s'exerce sur une molécule sphérique de rayon R_H en mouvement à la vitesse \vec{v} sous l'effet de l'agitation thermique est de la forme :

$$\vec{F} = -f\vec{v} = -6\pi\eta R_H \vec{v} \quad (1.2)$$

où η est la viscosité dynamique du fluide.

En combinant les équations 1.1 et 1.2 on obtient une expression générale de D :

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H} \quad (1.3)$$

Si les molécules sont fortement concentrées dans le milieu fluide, l'expression du coefficient de diffusion libre D est légèrement modifiée pour prendre en compte la fraction volumique Φ occupée par les molécules dans le fluide :

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta(1+2.5\Phi)R_H} \quad (1.4)$$

Cette expression est également conservée si la fraction volumique est occupée par d'autres molécules que les molécules d'intérêt. Dans tous les cas, quand la fraction volumique Φ ne peut pas être négligée, on parle d'encombrement moléculaire.

1.1.2. La théorie du mouvement brownien

La probabilité qu'une molécule initialement à la position \vec{r}_0 se trouve à la position \vec{r} au temps t obéit à la deuxième loi de Fick :

$$\frac{\partial P(\vec{r}_0|\vec{r},t)}{\partial t} = D * \nabla^2 P(\vec{r}_0|\vec{r},t) \quad (1.5)$$

Dans le cas où la diffusion est non restreinte (molécule suffisamment éloignée de tout obstacle), la solution de l'équation donne une distribution de probabilité gaussienne :

$$P(\vec{r}_0|\vec{r},t) = (4\pi Dt)^{-3/2} * \exp\left(\frac{-(\vec{r}-\vec{r}_0)^2}{4Dt}\right) \quad (1.6)$$

La moyenne quadratique du déplacement parcouru par les molécules pendant le temps t est définie par l'équation d'Einstein-Smoluchowski :

$$\langle(\vec{r} - \vec{r}_0)^2\rangle = \int (\vec{r} - \vec{r}_0)^2 * P(\vec{r}_0|\vec{r},t) d\vec{r} = 6Dt \quad (1.7)$$

De manière analogue, si on étudie le mécanisme de diffusion dans une seule direction x, y ou z , on obtient :

$$P(z_0|z, t) = (4\pi Dt)^{-1/2} * \exp\left(\frac{-(z-z_0)^2}{4Dt}\right) \quad (1.8)$$

$$\langle (z - z_0)^2 \rangle = \int (z - z_0)^2 * P(z_0|z, t) dz = 2Dt \quad (1.9)$$

1.2. Mesure de la diffusion libre par RMN

Les premiers travaux de Hahn sur les échos de spin ont montré que l'amplitude de l'écho est influencée par la diffusion brownienne si le champ magnétique B_0 est inhomogène (Hahn, 1950). Par la suite, Stejskal et Tanner ont proposé une séquence d'écho de spin modifiée par l'ajout de gradients pulsés (figure 1.2.1) dans le but de mesurer le coefficient de diffusion D (Stejskal and Tanner, 1965). Le principe de base repose sur la pondération de l'amplitude du signal mesuré par le coefficient de diffusion, à l'aide de gradients appelés « gradients de diffusion ». L'expression théorique de l'atténuation repose sur la résolution des équations de Bloch-Torrey (Torrey, 1956).

1.2.1. Mesure de D avec l'approximation des gradients de diffusion très courts

Dans la séquence d'écho de spin modifiée de Stejskal et Tanner (figure 1.2.1), l'application de deux gradients de diffusion de part et d'autre d'une impulsion π va permettre de déphaser puis rephaser les spins en fonction de leur position. En effet, si un gradient \vec{G} est appliqué pendant un délai δ suffisamment court, alors le déplacement de chaque spin pendant l'application des gradients de diffusion peut être négligé. Chaque spin acquiert donc une phase qui dépend de sa position \vec{r} et dont l'expression est de la forme :

$$\phi(t) = \int_0^\delta \gamma \vec{G}(t) \vec{r} dt \quad (1.10)$$

où γ est le rapport gyromagnétique.

Après l'impulsion $\pi/2$, les spins sont soumis au premier gradient de diffusion d'amplitude constante G et d'une durée δ . D'après l'expression 1.10, chaque spin acquiert alors une phase: $\phi_0 = \gamma \vec{G} \vec{r}_0 \delta$ où \vec{r}_0 est la position initiale des spins. Pendant un délai Δ , les spins sont libres de se déplacer mais leur phase n'évolue pas. Néanmoins, l'application de l'impulsion π pendant ce délai inverse toutes les phases. Après un temps Δ , chaque spin a une phase $-\phi_0$ et une nouvelle

position \vec{r} . L'application du deuxième gradient (d'amplitude G et durée δ) induit un nouveau déphasage : $\phi_f = \gamma \vec{G} \vec{r} \delta$. La phase finale des spins est alors donnée par l'expression:

$$\Delta\phi = \phi_f - \phi_0 = \gamma \vec{G} (\vec{r} - \vec{r}_0) \delta \quad (1.11)$$

Si les spins sont restés immobiles ($\vec{r} = \vec{r}_0$) pendant Δ , alors ils auront une phase nulle. Les spins déphasés par le premier gradient sont parfaitement rephasés par le deuxième gradient. Au contraire, si les spins sont mobiles ($\vec{r} \neq \vec{r}_0$) alors ils auront une phase proportionnelle à leur déplacement.

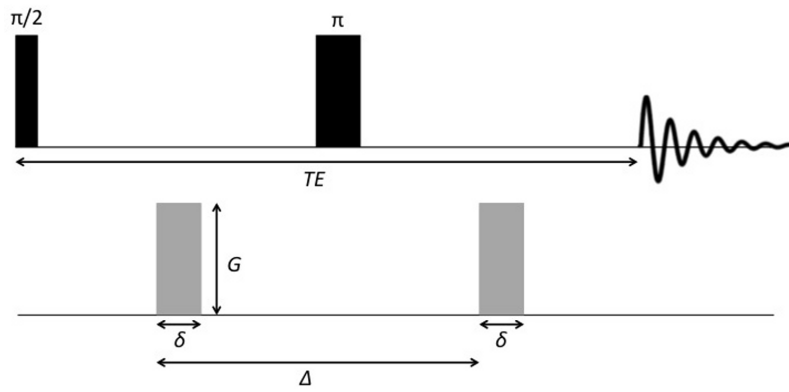


Figure 1.2.1 : Séquence d'écho de spin modifiée de Stejskal and Tanner

Le signal S mesuré par RMN correspond à la somme du signal d'un ensemble de N spins individuels. Le déphasage de chaque spin (somme non cohérente) conduit à une atténuation globale du signal RMN. L'expression de l'atténuation du signal est :

$$\frac{S}{S_0} = \frac{1}{N} \sum_{p=1}^N e^{i\phi_p} \quad (1.12)$$

avec S_0 le signal mesuré en l'absence de gradients de diffusion ($\vec{G} = \vec{0}$).

En passant à la limite continue, l'atténuation du signal RMN s'exprime alors sous la forme :

$$\frac{S}{S_0} = \iint_{-\infty}^{+\infty} e^{i\gamma \vec{G} \delta (\vec{r} - \vec{r}_0)} P(\vec{r}|\vec{r}_0, t) d\vec{r} d\vec{r}_0 \quad (1.13)$$

où $P(\vec{r}|\vec{r}_0, t)$ décrit la probabilité qu'un spin initialement à la position \vec{r}_0 se trouve à la position \vec{r} après un temps t .

Dans un milieu fluide, l'expression de $P(\vec{r}|\vec{r}_0, t)$ est donnée par l'expression 1.6. La combinaison des équations 1.6. et 1.13 donne une expression simplifiée de l'atténuation :

$$\frac{S}{S_0} = e^{-\gamma^2 G^2 \delta^2 \Delta D} \quad (1.14)$$

En introduisant $b = \gamma^2 G^2 \delta^2 \Delta$ où b est le coefficient de pondération en diffusion, on obtient une expression de l'atténuation de la forme :

$$\frac{S}{S_0} = e^{-bD} \quad (1.15)$$

En réalité, afin de définir l'expression générale de b pour toute séquence de spectroscopie pondérée en diffusion il est nécessaire de résoudre l'équation de Bloch-Torrey.

1.2.2. Mesure de D dans le cas général

L'équation de Bloch, introduite par Felix Bloch en 1946, définit l'évolution des trois composantes de l'aimantation d'un ensemble de spins. Cette équation peut être modifiée afin de prendre en compte le terme de diffusion. On parle alors de l'équation de Bloch-Torrey. En présence d'un gradient de diffusion \vec{G} et en négligeant les termes de relaxation, cette équation est de la forme :

$$\frac{\partial \vec{M}(\vec{r}, t)}{\partial t} = \vec{M}(\vec{r}, t) \times \gamma (B_0 + \vec{G}(t) * \vec{r}) + D \Delta \vec{M}(\vec{r}, t) \quad (1.16)$$

Pour la composante transversale M_{xy} (où $M_{xy} = M_x + iM_y$), l'équation s'écrit :

$$\frac{\partial \vec{M}_{xy}(\vec{r}, t)}{\partial t} = \vec{M}_{xy}(\vec{r}, t) \times \gamma (B_0 + \vec{G}(t) * \vec{r}) + D \Delta \vec{M}_{xy}(\vec{r}, t) \quad (1.17)$$

La résolution de l'équation 1.17 donne :

$$M_{xy}(\vec{r}, t) = M_0 \exp \left(-i \left(\int_0^t \vec{G}(t') dt' \right) * \vec{r} \right) * \exp \left(-\gamma^2 D \int_0^t \left[\int_0^{t'} \vec{G}(t'') dt'' \right]^2 dt' \right) \quad (1.18)$$

Si au temps t , l'intégrale des gradients est nulle (condition nécessaire pour créer un écho) alors :

$$M_{xy}(t) = M_0 \exp \left(-D \int_0^t \left[\int_0^{t'} \gamma \vec{G}(t'') dt'' \right]^2 dt' \right) = M_0 \exp \left(-D \int_0^t \vec{k}^2(t') dt' \right) \quad (1.19)$$

où $\vec{k}(t)$ correspond à l'intégrale des gradients entre 0 et t (moment d'ordre zéro).

L'expression générale du facteur b est :

$$b = \int_0^t \vec{k}^2(t') dt' \quad (1.20)$$

En combinant les expressions 1.19 et 1.20 :

$$M_{xy}(t) = M_0 e^{-bD} \quad (1.21)$$

$$\frac{S}{S_0} = e^{-bD} \quad (1.22)$$

avec S et S_0 les signaux mesurés par RMN avec et sans gradients de diffusion.

Application : La séquence d'écho de spin modifiée

Pour la séquence d'écho de spin modifiée de Stejskal and Tanner (figure 1.2.1), le coefficient de pondération de diffusion s'écrit alors :

$$b = \gamma^2 \left(\int_0^\delta G^2 t'' dt'' + \int_\delta^\Delta G^2 \delta^2 dt'' + \int_\Delta^{\Delta+\delta} G^2 (t'' - (\delta + \Delta)) dt'' \right) = \gamma^2 G^2 \delta^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3} \right) = \gamma^2 G^2 \delta^2 t_d \quad (1.23)$$

où t_d correspond au temps de diffusion ($t_d = \Delta - \frac{\delta}{3}$). De plus, si les gradients de diffusion sont sur les trois axes alors : $G^2 = G_x^2 + G_y^2 + G_z^2$. Si $\delta \ll \Delta$, alors on retrouve l'expression 1.15.

D'après l'expression 1.22, la valeur du coefficient de diffusion D peut être déterminée par régression linéaire en traçant le logarithme de l'atténuation du signal RMN en fonction de b . Pour obtenir différentes valeurs de b , il est possible de varier G , δ ou Δ . Cependant, augmenter δ a pour conséquence de changer le temps d'écho TE et donc modifier l'amplitude du signal (relaxation T_2 et J-modulation), ce qui complique la mesure du coefficient de diffusion. Généralement, l'amplitude du gradient de diffusion G est variée avec ou sans variation de Δ .

Notons tout de même que l'expression du coefficient b est correcte uniquement pour des gradients de diffusion de forme rectangulaire (temps de montée nul). En pratique, les gradients sont de forme trapézoïdale ou sinusoïdale. L'expression exacte de b est alors différente (Mattiello et al., 1994). Pour des gradients de forme trapézoïdale, l'expression de b devient :

$$b = \gamma^2 G^2 (\delta^2 * (\Delta - \frac{\delta}{3}) + \frac{1}{30} \varepsilon^3 - \frac{1}{6} \delta \varepsilon^2) \quad (1.24)$$

où δ correspond au délai entre le début de la montée du gradient et la fin du plateau et où ε est le temps de montée.

Par la suite, de nouvelles séquences de diffusion ont été implémentées, comme la séquence STEAM (STimulated Echo Acquisition Mode) pondérée en diffusion (Tanner, 1970) ou encore la séquence PRESS avec des gradients de diffusion bipolaires positionnés de part et d'autres des deux impulsions π (Reese et al., 2003). De même, des gradients avec des formes plus sophistiquées tels que les gradients oscillants (Does et al., 2003) ont été développés. Pour chaque séquence, l'expression du coefficient de pondération en diffusion b peut alors être définie à partir de l'expression 1.20.

1.2.3. Prise en compte des termes croisés

En général, les gradients de sélection de coupe, les crushers, et les gradients de refocalisation contribuent à la pondération en diffusion. L'amplitude de ces gradients est souvent plus faible que celle des gradients de diffusion, c'est pourquoi leur effet est souvent négligé. Cependant, dans certaines conditions (chapitres 3 et 6), il est nécessaire de les intégrer dans le calcul du coefficient de pondération en diffusion b (Mattiello et al., 1997) :

$$b = \gamma^2 \int_0^t k^2(t') dt' = \gamma^2 \int_0^t \left[\int_0^{t'} (\vec{G}(t'') + \vec{G}_{im}(t'')) dt'' \right]^2 dt' \propto \vec{G}^2 + \vec{G}_{im}^2 + \vec{G} \vec{G}_{im} \quad (1.25)$$

où \vec{G}_{im} représente l'ensemble des gradients d'imagerie de la séquence (autres que les gradients de diffusion). Le dernier terme de cette expression correspond aux termes croisés. Différentes approches ont été développées pour supprimer leur contribution (chapitres 3 et 6).

1.2.4. Apport de la RMN pour la mesure de la diffusion

D'autres techniques, non fondées sur le principe de la RMN, permettent également de mesurer le coefficient de diffusion D . Parmi les méthodes couramment utilisées pour étudier le milieu biologique, on peut retenir la microscopie de fluorescence (spectroscopie de corrélation de fluorescence – FCS, la redistribution de fluorescence après photoblanchiment – FRAP), la diffusion dynamique de la lumière ou DLS et le suivi de particule unique ou SPT (techniques optiques), l'autoradiographie et la résonance paramagnétique électronique ou RPE (McEwen

and Grafstein, 1968 ; Axelrod et al., 1976 ; Keith et al., 1977 ; Mastro et al., 1984 ; Saxton and Jacobson, 1997 ; Berne et al., 2000 ; Schwille, 2001 ; Weiss et al., 2003 ; Santamaria et al., 2006). Cependant la mesure de D repose sur le suivi de molécules exogènes et/ou l'utilisation d'un marquage (fluorescence, radioactivité...). A l'opposé, la RMN permet d'étudier le déplacement de molécules endogènes *in vivo* de manière non invasive et non ionisante.

1.3. Mesure de la diffusion dans le milieu biologique par RMN

1.3.1. Description du milieu biologique

La cellule est délimitée par une membrane plasmique qui crée une barrière entre le milieu intra- et extracellulaire. Le milieu intracellulaire est caractérisé par la présence d'un cytosol, d'un cytosquelette (filaments d'actine, filaments intermédiaires, microtubules...) et de nombreuses organelles (réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, lysosomes, mitochondries, noyau...). Les organelles sont, comme la cellule, entourées d'une membrane plasmique ce qui permet de les isoler du reste de la cellule (figure 1.3.1). Ainsi, le milieu intracellulaire n'est ni libre ni homogène. De nombreux obstacles entravent la diffusion (restriction et tortuosité) tandis que certains mécanismes permettent de faciliter le déplacement des molécules (transports actifs). En raison de ces différents phénomènes, le coefficient de diffusion mesuré dans le milieu biologique n'est pas égal au coefficient de diffusion libre (Nicolay et al., 2001). On peut définir un coefficient de diffusion effectif D_{eff} . Par analogie avec les expressions 1.7 et 1.9, on a : $D_{eff} = \langle (\vec{r} - \vec{r}_0)^2 \rangle / 6t$. Dans la suite, nous porterons une attention toute particulière la dépendance de D_{eff} au temps de diffusion dans ce contexte de diffusion non-libre.

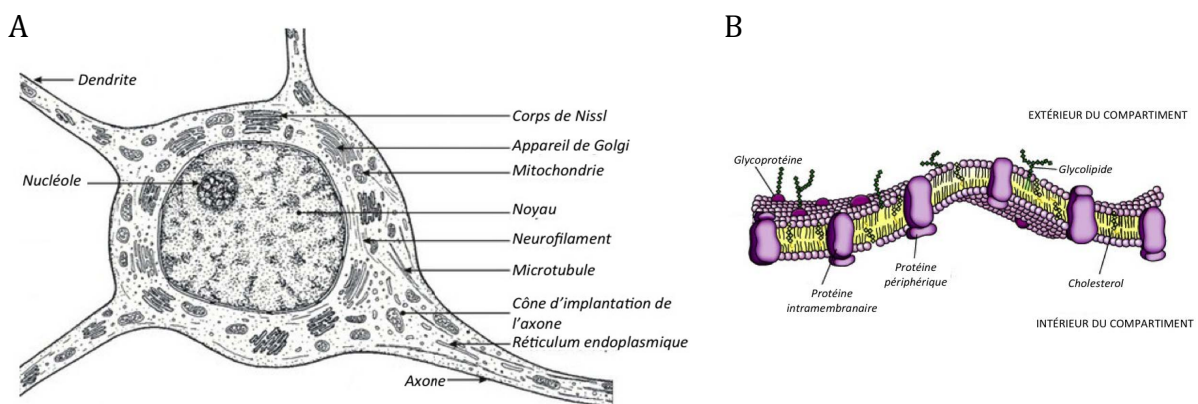


Figure 1.3.1 : Description du milieu biologique : corps cellulaire d'un neurone (A) et membrane plasmique (B).

1.3.2. La diffusion est restreinte et tortueuse

La diffusion restreinte correspond à la diffusion dans des compartiments clos tels que les cellules ou organelles (mitochondries, noyaux cellulaires...) dont les membranes plasmiques sont plus ou moins perméables. Le passage d'un compartiment à un autre nécessite donc de franchir la membrane (barrière). Dans le cas où les membranes sont imperméables (trajectoire bleue sur la figure 1.3.2) le déplacement quadratique moyen est limité par la taille d du compartiment dans lequel se déplace la molécule. Il est par exemple clair, que dans le cas d'une diffusion entre deux plans, la relation suivante est vraie :

$$\langle (x - x_0)^2 \rangle \leq \frac{1}{d^2} \iint_0^d (x - x_0)^2 dx dx_0 = \frac{d^2}{6} \quad (1.26)$$

La diffusion tortueuse correspond à la diffusion dans un environnement où la présence d'obstacles (organelles avec des membranes plasmiques imperméables, des microtubules...) oblige les molécules à utiliser un chemin tortueux (trajectoire rouge sur la figure 1.3.2). La diffusion des molécules n'est pas limitée dans l'espace mais le parcours est entravé, ce qui empêche les molécules d'aller en ligne droite. On peut, par exemple, comparer un espace tortueux à un labyrinthe infini.

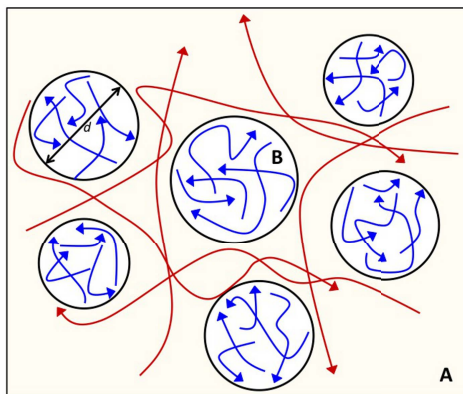


Figure 1.3.2 : Illustration de deux types de diffusion dans les milieux biologiques : la diffusion tortueuse (rouge) dans un espace non clos en présence d'obstacles (A) et la diffusion restreinte (bleue) dans un espace clos (B). Ici, la paroi des compartiments est imperméable. La diffusion à l'intérieur des compartiments (B) est donc limitée par leurs tailles respectives (d). Figure adaptée de l'article de Le Bihan, 2003

Si le temps de diffusion est infiniment court, les molécules n'ont pas le temps de rencontrer les obstacles intracellulaires (la distance quadratique moyenne est très petite devant la taille des

compartiments et la distance inter-obstacles). La diffusion peut alors être assimilée à la diffusion libre : $D_{eff} = D$. A l'inverse, plus le temps de diffusion est long, plus les molécules sont sensibles aux phénomènes de restriction et de tortuosité ce qui entraîne une diminution de D_{eff} avec le temps de diffusion: $D_{eff} < D$. Comme illustré sur la figure 1.3.3, pour des temps infiniment longs, on peut alors différencier la diffusion restreinte de la diffusion tortueuse:

- dans le cas d'une diffusion uniquement restreinte, D_{eff} devient nul puisque, si les frontières sont imperméables, la distance quadratique moyenne est bornée (équation 1.26).
- au contraire, dans le cas d'une diffusion uniquement tortueuse, la distance quadratique moyenne augmente linéairement avec le temps de diffusion comme si la diffusion était libre mais à un rythme plus faible : $D_{eff} = D/T^2$ où T correspond à la tortuosité du milieu intracellulaire.

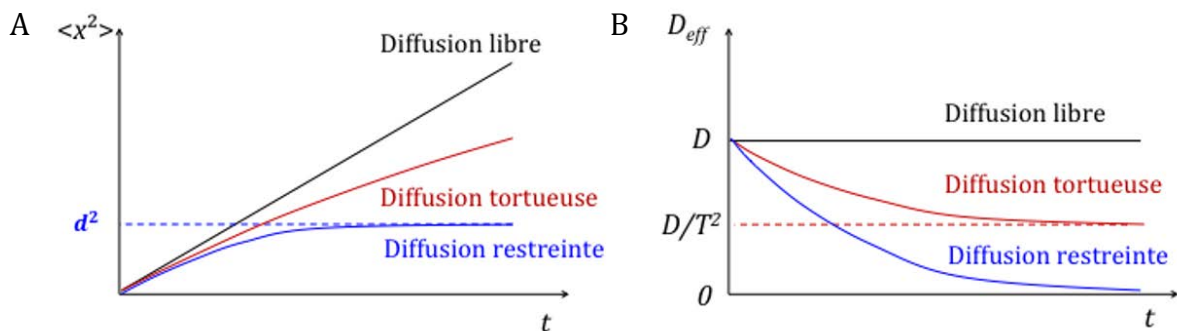


Figure 1.3.3 : Variation de la distance quadratique moyenne (A) et de D_{eff} (B) en fonction du temps de diffusion dans le cas de la diffusion libre (noir), tortueuse (rouge) et restreinte (bleue)

Dans le milieu biologique, les deux phénomènes (restriction et tortuosité) sont combinés. Expérimentalement, il est donc difficile de les distinguer. On parle généralement de restriction au sens large (combinaison des effets de restriction et tortuosité). Des modèles mathématiques permettent de décrire la diffusion restreinte : diffusion entre des plans parallèles infinis, cylindres ou sphères (chapitre 2).

1.3.3. La diffusion est assistée

Dans le milieu intracellulaire, le transport actif facilite la diffusion des molécules (phénomène de convection). Les molécules cellulaires (protéines, lipides, ions et les métabolites) sont transportées de leur site de synthèse à leur site d'utilisation puis à leur site de dégradation. Le

transport actif utilise l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP) en adénosine diphosphate (ADP) et phosphate inorganique (Pi) : $\text{ATP} + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ADP} + \text{Pi} + \text{H}_3\text{O}^+$. La conversion de l'ATP en ADP est en effet une réaction exergonique dont la variation d'enthalpie libre est $\Delta G = -30.5 \text{ kJ.mol}^{-1}$. On oppose le transport actif au transport passif (gradient de concentration ou gradient électrochimique) qui ne nécessite aucune source d'énergie.

Transport actif cytoplasmique

Les microtubules (MT) et les filaments d'actine jouent un rôle important dans le transport des molécules dans le milieu intracellulaire des cellules « polarisées » (Nelson, 1991 ; Mays et al., 1994). Des protéines dites motrices s'associent aux MT (kinésine et dynéine) et aux filaments d'actine (myosine). En présence d'ATP, elles sont capables de changer de conformation et de migrer le long des filaments dans un sens précis. Pendant leur déplacement, elles transportent des composants cellulaires (organelles, vésicules). Ce type de transport est très important en particulier dans les neurones où certaines régions ont des fonctions particulières (Morris and Hollenbeck, 1995 ; Hirokawa, 1998). Il a été montré que les microtubules facilitent le transport sur de grandes distances (le long des axones et des dendrites) tandis que les filaments d'actines jouent un rôle important pour les transports sur de courtes distances (transfert vers les synapses) (Franker and Hoogenraad, 2013).

Dans le cytoplasme, un autre type de transport facilite la migration des molécules : les courants cytoplasmiques, ou cycloses. Ces derniers désignent le mouvement du cytoplasme dans la cellule. Le cytosol est un liquide aqueux sans structure stable. Il évolue entre une consistance gel et une consistance fluide. Les changements d'état du cytosol, liés à la dislocation et reconstruction des réseaux de filaments d'actine, entraînent une modification de sa viscosité ce qui engendre potentiellement des mouvements intracellulaires. Ce phénomène, connu dans les cellules végétales (déplacement des chloroplastes) et amibes, est également évoqué pour expliquer le transport cytoplasmique dans les cellules animales, bien que le nombre d'observations directes soit limité, et à notre connaissance encore nul dans les cellules cérébrales (Sherwin et al., 1967 ; Agutter et al., 1995 ; Wheatley, 1999 ; Brangwynne et al., 2008 ; Yi et al., 2011).

Transport actif transmembranaire

Les protéines transmembranaires traversent au moins une fois la membrane cellulaire. Elles sont donc en contact avec trois environnements : le milieu extra- et intracellulaire et les lipides de la membrane. Certaines protéines transmembranaires ont la capacité de reconnaître des molécules spécifiques et de leur permettre de traverser la membrane. Elles utilisent l'énergie

fournie par l'ATP et agissent comme des pompes. On distingue deux types de pompes : les pompes ABC (ATP Binding Cassette) qui permettent le transport de molécules organiques (petits peptides) et les pompes pour le transport des ions minéraux (pompe sodium/potassium, pompe calcium, pompe à proton).

Effet du transport actif sur D_{eff}

A priori, une mesure de D_{eff} est sensible à la diffusion assistée. Si le temps de diffusion est infiniment court, là encore, les molécules n'ont pas le temps d'être sensible au transport actif. La diffusion peut donc être assimilée à la diffusion libre : $D_{eff} = D$. A l'inverse, plus le temps de diffusion est long, plus la diffusion des molécules est facilitée. Les distances quadratiques parcourues sont alors plus importantes que si les molécules diffusaient librement, ce qui entraîne une augmentation de D_{eff} avec le temps de diffusion : $D_{eff} > D$ (figure 1.3.4). On peut par exemple considérer le cas extrême du transport « balistique » dans lequel chaque molécule évolue à une vitesse constante (dont la direction et l'amplitude peuvent être propre à chaque molécule) : on a alors $\langle x^2 \rangle \propto t^2$ et donc $D_{eff} \propto t$. En réalité, la vitesse de chaque molécule engagée dans un transport actif ne va pas rester inchangée quand t tend vers l'infini. D_{eff} ne pourra donc sans doute jamais croître linéairement avec le temps dans un système biologique, il finira par atteindre un plateau.

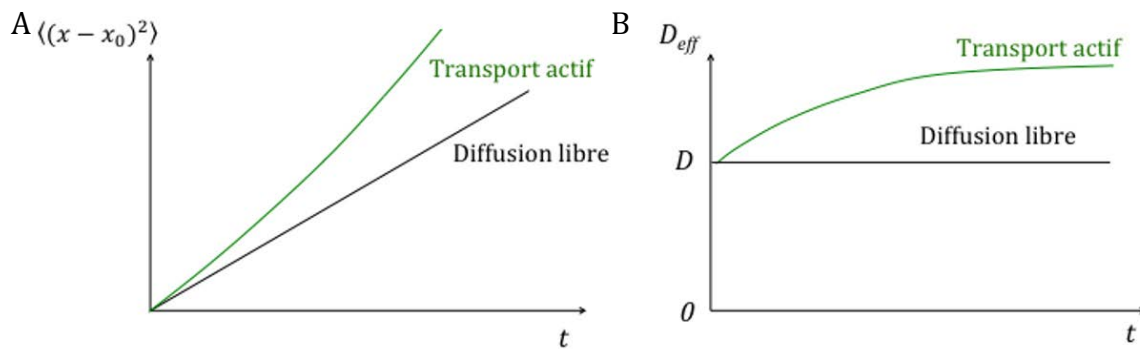


Figure 1.3.4 : Variation de la distance quadratique moyenne (A) et de D_{eff} (B) en fonction du temps de diffusion dans le cas de la diffusion libre (noir) et assistée (vert).

En conclusion, dans le milieu biologique, D_{eff} est le reflet de nombreuses composantes intra- et extracellulaires : restriction, tortuosité, transport actif. D'après les figures 1.3.3 et 1.3.4, on remarque qu'il est possible de distinguer le transport actif et la diffusion encombrée (restriction et tortuosité) en utilisant la dépendance de D_{eff} au temps de diffusion. D_{eff} dépend également de la viscosité du milieu. Ainsi, une variation de D_{eff} est directement reliée à une modification de l'espace intracellulaire.

1.3.4. Mesure de l'ADC par RMN

A l'instar de l'imagerie de diffusion qui étudie le mouvement des molécules d'eau, la spectroscopie RMN pondérée en diffusion permet d'explorer non seulement la diffusion des molécules d'eau mais aussi celle des métabolites cérébraux fortement concentrés (de l'ordre de quelques mM). Les molécules d'eau sont présentes dans toutes les cellules, dans le milieu extracellulaire et traversent les membranes plasmiques. Au contraire, les métabolites apportent une information plus spécifique puisqu'ils sont majoritairement caractéristiques du milieu intracellulaire dans lequel ils diffusent (Pfeuffer et al., 2000) et d'un type cellulaire (figure 1.3.5). Dans le tissu cérébral, les métabolites les plus largement étudiés sont : le N-Acetyl-Aspartate total ($tNAA = NAA + NAAG$), le glutamate, les composés choline ($tCho = GPC + PCho + Cho$), le myo-inositol et la créatine totale ($tCr = Cr + PCr$). Le $tNAA$ et le glutamate sont des marqueurs neuronaux. La $tCho$ est deux à trois fois plus concentrée dans les astrocytes et le myo-inositol est majoritairement compartimenté dans les astrocytes. Enfin, la tCr est présente en concentration équivalente dans les neurones et les astrocytes (Brand et al., 1993 ; Urenjak et al., 1993 ; Choi et al., 2007). Ainsi, la mesure du coefficient de diffusion des métabolites par spectroscopie RMN pondérée en diffusion permet d'obtenir des informations sur la microstructure des neurones et des astrocytes.

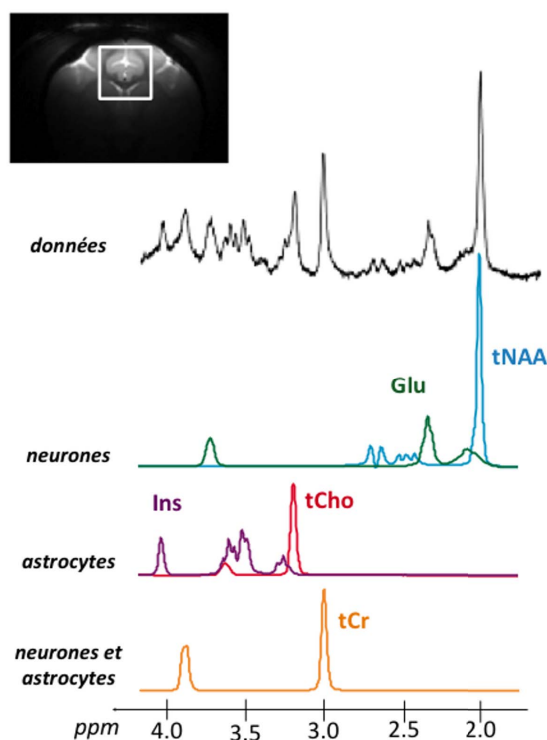


Figure 1.3.5 : Spectre acquis dans un large voxel dans le cerveau du macaque et décomposition LCMoel. Le $tNAA$ et le glutamate sont des marqueurs neuronaux tandis que le myo-inositol et la $tCho$ sont des marqueurs astrocytaires. La tCr est présente dans les deux compartiments.

Approximation de la diffusion gaussienne

La diffusion dans le milieu biologique dépend de nombreux paramètres intracellulaires. Une régression linéaire du logarithme de l'atténuation du signal en fonction de b (équation 1.22) ne permet pas de mesurer le coefficient de diffusion libre. Cependant, pour des petites valeurs de b (figure 1.3.6-A), on peut tout de même approximer le propagateur $P(\vec{r}_0|\vec{r}, t)$ par une fonction gaussienne (Stepišnik, 1999 ; Pfeuffer et al., 2000 ; Yablonskiy and Sukstanskii, 2010). Dans ce contexte, l'atténuation reste mono-exponentielle, et un coefficient de diffusion apparent (noté ADC pour « *apparent diffusion coefficient* ») peut ainsi être estimé. On peut montrer que cet ADC est pratiquement égal à D_{eff} dans la direction d'application des gradients de diffusion :

$$ADC = -\frac{\ln(S/S_0)}{b} \sim D_{eff} = \frac{\langle (x-x_0)^2 \rangle}{2t_d} \quad (1.27)$$

Diffusion non-gaussienne

Aux grandes valeurs de b (figure 1.3.6-B), l'atténuation du signal *in vivo* dévie en général du modèle mono-exponentiel, il n'y a donc plus d'ADC au sens strict du terme. D'autres formalismes sont utilisés.

Le modèle bi-exponentiel :

L'atténuation est modélisée par la somme de deux exponentielles :

$$\frac{S}{S_0} = f_1 \exp(-b * ADC_1) + f_2 \exp(-b * ADC_2) \quad (1.28)$$

où ADC_1 et ADC_2 correspondent aux coefficients de diffusion des deux pools dont les fractions volumiques sont données par f_1 et f_2 (avec $f_2 = 1 - f_1$).

Une décroissance bi-exponentielle de l'atténuation du signal du tNAA puis de plusieurs métabolites a été observée chez le rat *in vivo* (Assaf and Cohen, 1998 ; Pfeuffer et al., 2000). Les deux pools ont des coefficients de diffusion très différents, l'un avec une diffusion rapide et l'autre avec une diffusion lente. Ce comportement peut être interprété :

- par la présence de plusieurs compartiments : par exemple les corps cellulaires où la restriction est importante conduisant donc à un coefficient de diffusion lent et les fibres (axones, dendrites)
- ou par des différences de restriction au sein d'un même compartiment (proche des membranes *versus* loin des membranes).

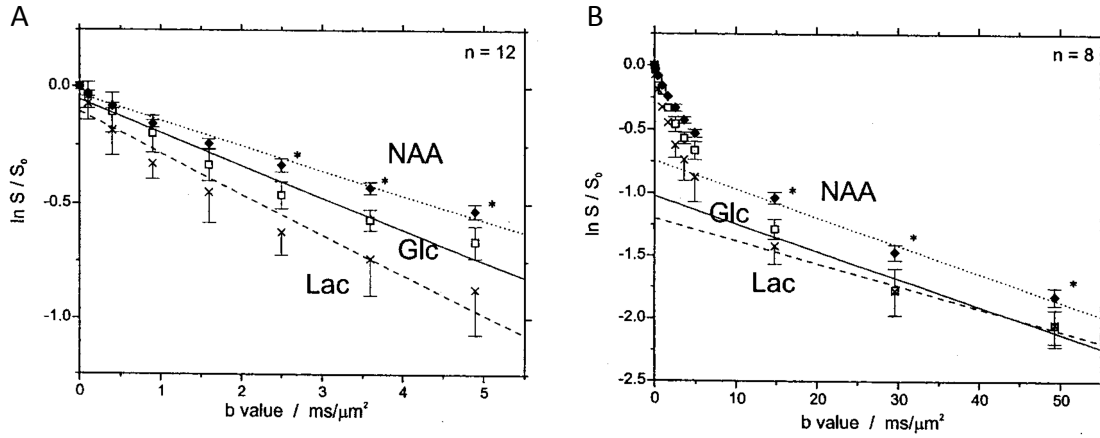


Figure 1.3.6 : Illustration du comportement gaussien (A) et non gaussien (B) de la diffusion en fonction de la valeur du coefficient de pondération en diffusion b . Figures extraites de l'article de Pfeuffer et al., 2000

Autres formalismes : d'autres modèles ont été développés dans le but de caractériser la diffusion non gaussienne. On peut retenir :

- le Kurtosis (Jensen and Helpen, 2010) qui estime le degré de non-gaussianité de la diffusion :

$$\ln(S(b)) = \ln(S_0) - b * ADC + \frac{1}{6}(b * ADC)^2 * K \quad (1.29)$$

où K est le facteur de Kurtosis. Si $K=0$ alors la diffusion est gaussienne.

- la fonction étirée (stretched exponential model) où la diffusion est décrite par une distribution continue de systèmes dont les propriétés de diffusion sont différentes (Bennett et al., 2003) :

$$\frac{S}{S_0} = \exp((-b * ADC)^\alpha) \quad (1.30)$$

avec $\alpha = [0,1]$.

- le q -space : quel que soit le phénomène de diffusion (gaussien ou non gaussien), l'équation 1.13 est toujours vérifiée. L'atténuation du signal peut alors s'écrire comme la transformée de Fourier de la distribution de probabilité du déplacement :

$$\frac{S}{S_0} = \iint_{-\infty}^{+\infty} e^{i2\pi q(\vec{r}-\vec{r}_0)} P(\vec{r}|\vec{r}_0, t) d\vec{r} d\vec{r}_0 \quad (1.31)$$

avec $q = \gamma G \delta / 2\pi$

On peut ainsi accéder à la distribution de probabilité par transformée inverse. Celle-ci dépend de la taille et de la géométrie du compartiment dans lequel a lieu la diffusion (Cory and Garroway, 1990 ; Callaghan et al., 1991). La principale difficulté de cette technique est la nécessité de mesurer le signal avec une très bonne résolution en q et jusqu'à des q très élevés pour que la transformée de Fourier ait un sens.

1.4. Applications et tendance actuelle

La spectroscopie RMN pondérée en diffusion a été utilisée dans l'étude de quelques pathologies. Cependant, une variation de l'ADC des métabolites peut être le reflet d'une modification conjointe ou non de plusieurs paramètres : température du milieu biologique, viscosité, restriction et tortuosité (liés à l'encombrement et au volume du milieu intracellulaire) ou encore transports actifs. Il est par conséquent difficile d'expliquer les causes précises d'une variation de l'ADC. Les études passées et actuelles s'attachent donc à mesurer la variation relative de l'ADC entre des conditions physiologiques et pathologiques afin d'explorer l'hypothèse d'une modification de la structure cellulaire, de manière peu spécifique quant aux mécanismes sous-jacents.

Dans le cas d'une ischémie cérébrale, Wick et al. ont mesuré chez le rat une décroissance de l'ADC de l'eau et des métabolites pendant l'accident ischémique (Wick et al., 1995). D'autres études menées chez le rat (Van der Toorn et al., 1996 ; Dijkhuizen et al., 1999 ; Abe et al., 2000 ; Dreher et al., 2001) et chez l'Homme (Harada et al., 2002 ; Zheng et al., 2012) ont montré des résultats similaires. La baisse de l'ADC des métabolites peut être corrélée à une augmentation de la restriction intracellulaire liée à une hausse de la viscosité du cytosol et dans les structures subcellulaires, une diminution des transports actifs (liée à une diminution du métabolisme énergétique), une augmentation de l'encombrement intracellulaire (augmentation du nombre de structures fibreuses liée à une fragmentation du cytosquelette et désagrégation des ribosomes), ou encore à une reconfiguration des structures fibrillaires (axones, dendrites, prolongements astrocytaires) en « perles » (Budde and Franck, 2010). Dans le cas de tumeurs cérébrales, une augmentation du coefficient de diffusion (+42% en moyenne) des métabolites (tNAA, tCr, tCho) et de l'eau (+36%) est observée chez l'Homme (Harada et al., 2002). Chez la souris (U87 glioblastome), l'ADC de certains métabolites augmente également (tNAA, glutamate, tCho, Ins) alors que celui de tCr reste stable (Valette et al., 2012). Dans les deux études, une hausse de l'ADC des métabolites peut être expliquée par une augmentation du volume cellulaire (gonflement) ou une diminution de la viscosité intracellulaire. Notons toutefois que dans une

étude chez le rat (gliome BT4C), aucune variation de l'ADC de tCho n'a été observée (Hakumaki et al., 1998). Une étude récente conduite avec des patients atteints de sclérose en plaques a montré une diminution de la diffusivité du tNAA (λ_{\parallel}) dans la direction parallèle à l'axe des neurones (-19%). Cette baisse est corrélée à la sévérité de la maladie. La mesure de l'ADC pourrait ici être sensible à une dégénérescence axonale (axonopathie) due à une démyélinisation des neurones (Wood et al., 2012). Enfin, l'ADC du tNAA, tCr et tCho augmentent dans les régions lésées (entre +35% et +55%) chez des patients atteints du syndrome MELAS (Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis and Stroke-like episodes). Le syndrome MELAS est caractérisé par une large atteinte mitochondriale. La hausse de l'ADC des métabolites peut être liée à une dégradation de la membrane des mitochondries conduisant à une diminution de la restriction ou une augmentation du volume suivi d'une diminution de la viscosité intra-mitochondriale (Liu et al., 2011). Le potentiel de la mesure de l'ADC des métabolites a aussi été évalué pour mettre en évidence une modification de la structure intracellulaire lors d'une stimulation du cortex visuel chez l'Homme (Branzoli et al., 2013). Dans cette étude, une hausse de l'ADC du tNAA (+3.3%), tCr (+3.9%) et tCho (+8.1%) a été quantifiée au cours de l'activation visuelle. De manière similaire aux études menées dans les tumeurs cérébrales ou le syndrome MELAS, l'augmentation des ADC peut être reliée à une diminution de la restriction et de la viscosité intracellulaire mais aussi à une augmentation des transports actifs liée à une augmentation du métabolisme énergétique au cours de l'activation visuelle.

Il apparaît donc que la spectroscopie pondérée en diffusion présente un fort potentiel pour la détection des altérations intracellulaires, mais elle reste encore trop « qualitative ». En effet, une simple mesure d'ADC ne permet pas d'extraire et de quantifier les paramètres définissant les propriétés structurales des cellules (viscosité, diamètre et orientation des axones, taille des organelles...). C'est dans cette perspective que de nouvelles approches de spectroscopie de diffusion ont été développées. Elles consistent par exemple à mesurer le logarithme de l'atténuation pour différentes valeurs de b en augmentant l'intensité G des gradients pour des délais δ et Δ constants, différentes valeurs de Δ et G en gardant la même valeur de b et δ ou différentes valeurs de q . Des modèles mathématiques mimant les phénomènes de restriction sont ensuite implémentés pour extraire des paramètres quantitatifs.

Ainsi, l'approche du q -space a été utilisée pour l'étude de la diffusion de l'eau et du tNAA dans des extraits de cerveaux de rat (Cohen and Assaf, 2002) et des extraits de nerfs optiques bovins (Assaf and Cohen, 1999). Dans une autre étude, la variation de b (δ et Δ fixes) permet d'estimer l'orientation des fibres et le coefficient de diffusion dans les directions parallèle et perpendiculaire à l'axe des fibres dans le corps calleux à partir de mesures de l'ADC du tNAA, de

la tCr et tCho chez l'Homme (Ronen et al., 2013). D'autres études, limitées au coefficient de l'eau, ont permis de mesurer la densité et le diamètre des fibres du corps calleux chez l'Homme et le macaque (Assaf et al., 2008, Alexander et al., 2010) et la fraction volumique de fibres dans plusieurs régions du cerveau du macaque *ex vivo* (Jespersen et al., 2007). Enfin, la mesure du coefficient de diffusion de l'adénosine triphosphate (ATP) et de la phosphocréatine (PCr) en fonction de Δ par spectroscopie du ^{31}P pondérée en diffusion pour différentes valeurs de Δ et G en gardant la même valeur de b et δ a permis de mesurer le diamètre des fibres musculaires chez le rat (de Graaf et al., 2000).

POTENTIEL DE LA SPECTROSCOPIE PONDEREE EN DIFFUSION POUR CARACTERISER L'ORGANISATION INTRACELLULAIRE

Dans les cellules du cerveau (les neurones et les astrocytes), la diffusion des métabolites est fortement restreinte par l'encombrement intracellulaire (présence d'organelles, de microtubules et de filaments d'actine), la viscosité du cytosol et la géométrie des compartiments dans lequel diffusent les métabolites (Nicolay et al., 2001). A l'inverse, l'existence des transports actifs est controversée. L'importance relative de chacun de ces paramètres et leur impact sur la diffusion des métabolites *in vivo* sont encore largement méconnus, même si un travail récent du laboratoire mesurant l'ADC des métabolites à temps de diffusion ultra-courts suggère que l'impact des transports actifs sur la mesure de l'ADC est peu significatif (Marchadour et al., 2012). C'est pourquoi, malgré l'observation d'une variation d'ADC des métabolites en conditions pathologiques, il est aujourd'hui difficile de conclure à une atteinte précise de la structure cellulaire. Pour lever cette indétermination, plusieurs approches sont possibles. La plus connue consiste à mesurer l'atténuation du signal RMN en fonction de la pondération en diffusion b à un temps de diffusion Δ (généralement inférieur à 100 ms) et à utiliser des modèles mathématiques de l'architecture cellulaire afin d'extraire certains paramètres structuraux tels que la densité, l'orientation et le diamètre des fibres (Jespersen et al., 2007 ; Assaf et al., 2008 ; Alexander et al., 2010 ; Ronen et al., 2013). Une autre approche possible, mais plus délicate, repose sur la mesure de l'atténuation du signal pour différentes valeurs de Δ pour une valeur de b (inférieure à 6000 s/mm²) et l'utilisation des mêmes modèles de la structure cellulaire. En effet, comme nous l'avons souligné au chapitre précédent, l'atténuation du signal mesuré par RMN dépend des différentes propriétés cellulaires selon la valeur du temps de diffusion. Notre objectif étant de caractériser les propriétés microstructurales des cellules du cerveau, la première étape de ce travail a consisté à comparer ces deux approches (variation de b versus variation de Δ) en termes de sensibilité et de capacité à définir l'importance relative de chaque paramètre biophysique (viscosité, tortuosité, taille et géométrie des compartiments de diffusion).

2.1. Détermination de la méthode optimale pour caractériser la géométrie intracellulaire

Dans cette partie nous proposons de déterminer la capacité de chaque méthode à extraire de manière spécifique certains paramètres de la structure cellulaire. Notre démarche, sans doute imparfaite, repose sur l'utilisation de modèles analytiques de la structure cellulaire et sur la mesure de l'impact relatif de variation des paramètres d'intérêt sur la mesure de l'ADC. L'idée sous-jacente étant de quantifier quelle « fraction » de l'ADC reflète chacun de ces paramètres.

2.1.1. Modèles analytiques de l'architecture cellulaire

En spectroscopie RMN, le signal des métabolites provient d'un large volume d'intérêt (que l'on appellera « voxel ») afin d'améliorer le rapport signal-sur-bruit ($SNR \propto \text{volume du voxel}$). Le voxel contient un grand nombre de cellules avec des propriétés et des géométries différentes. Parmi le vaste ensemble de cellules, on distingue notamment les neurones et les astrocytes (figure 2.1.1). Le neurone est composé d'un corps cellulaire (soma), d'un long axone et de plusieurs dendrites (Purves et al., 2004, Lopez-Munoz et al., 2006). Un astrocyte est une cellule gliale. Il a une forme étoilée. Ses prolongements cytoplasmiques peuvent être courts mais nombreux (astrocytes protoplasmiques de la substance grise) ou au contraire longs mais moins ramifiés (astrocytes fibreux de la substance blanche) (Nedergaard et al., 2003 ; Oberheim et al., 2012). Le rapport du nombre de cellules gliales (astrocytes, microglie, oligodendrocytes) sur le nombre de neurones varie fortement en fonction de l'espèce et de la région cérébrale considérée. Une étude récente a montré qu'une augmentation du rapport du nombre de cellules gliales sur le nombre de neurones est corrélée à une diminution de la densité neuronale et une augmentation de la taille des neurones alors que la densité des cellules gliales varie peu (Herculano-Houzel, 2014)

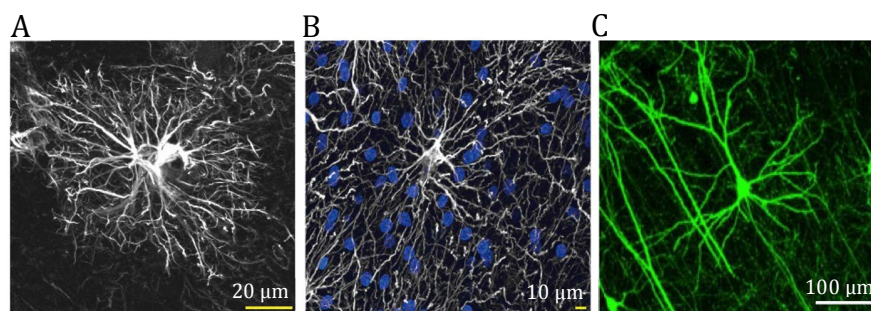


Figure 2.1.1 : Architecture cellulaire. Exemples d'astrocytes protoplasmiques (A) et fibreux (B) chez l'Homme (Oberheim et al., 2009) et neurone pyramidal (C) chez la souris adulte (Lee et al., 2006).

Les prolongements neuronaux et astrocytaires sont constitués de plusieurs segments avec des longueurs variables. Le long d'un seul prolongement, on compte de nombreux nœuds où apparaissent de nombreuses ramifications (Alpar et al., 2006 ; Cuntz et al., 2012). Il n'existe aujourd'hui aucun modèle analytique permettant de prendre en compte toute la complexité des cellules neuronales et astrocytaires (nombre de nœuds, longueur de chaque segment, nombre de ramification à chaque nœud, densité des épines dendritiques...). Néanmoins, l'utilisation d'un modèle simplifié de la structure neuronale et astrocytaire peut permettre d'extraire les principales caractéristiques de la diffusion dans le milieu intracellulaire : le soma et les organelles intracellulaires peuvent être modélisés par des sphères tandis que les fibres (prolongements astrocytaires, axones, dendrites) peuvent être représentées par des cylindres (en première approximation, on négligera l'existence des ramifications).

Nous avons implémenté sur Matlab (The Mathworks, Natick, MA, USA) deux modèles analytiques : le modèle des « corps cellulaires » et le modèle des « neurites » (Balinov et al., 1993 ; Linse and Söderman, 1995). Ces modèles utilisent l'approximation des gradients courts (SGPA : short gradient pulse approximation) et sont valides pour toutes valeurs de b .

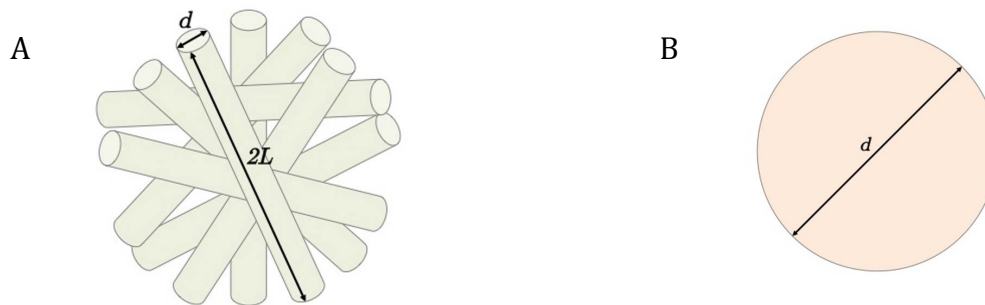


Figure 2.1.2 : Modèles analytiques pour la diffusion des métabolites dans le milieu intracellulaire : modèle des « neurites » (A) et modèle des « corps cellulaires » (B).

Le modèle des « neurites »

Dans ce modèle, les métabolites diffusent dans des cylindres, de diamètre d et de longueur $2L$, creux, imperméables et orientés isotropiquement dans les trois directions x, y et z (figure 2.1.2). La longueur L correspond à la longueur d'une fibre neuronale ou astrocytaire. Chaque cylindre fait un angle θ avec le gradient de diffusion (figure 2.1.3). On distingue alors deux régimes :

- dans le plan perpendiculaire à l'axe du cylindre, la diffusion est restreinte par les parois du cylindre et le gradient de diffusion effectif est $G_{max} * \sin(\theta)$

- dans le plan parallèle à l'axe du cylindre, la diffusion est restreinte par les extrémités du cylindre et le gradient de diffusion effectif est $G_{max} * \cos(\theta)$

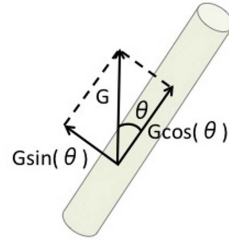


Figure 2.1.3 : Décomposition du vecteur gradient G

L'atténuation du signal RMN est définie par l'expression suivante (Balinov et al., 1993 ; Linse and Söderman, 1995) :

$$E(\delta, \Delta, G) = \left\{ \frac{[2 * J_1(\gamma G_{\perp} \delta R)]^2}{(\gamma G_{\perp} \delta R)^2} + 8 * (\gamma G_{\perp} \delta R)^2 * A_{nm} \right\} * \left\{ \frac{2(1 - \cos(\gamma G_{\parallel} \delta L'))}{(\gamma G_{\parallel} \delta L')^2} + 4 * (\gamma G_{\parallel} \delta L')^2 * B_{nm} \right\} \quad (2.1)$$

avec :

$$A_{nm} = \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{1 + \delta_{n0}} * [J'_n(\gamma G_{\perp} \delta R)]^2 * \sum_{m=1}^{\infty} \frac{\alpha_{nm}^2}{(\alpha_{nm}^2 - n^2) * [\alpha_{nm}^2 - (\gamma G_{\perp} \delta R)^2]^2} * e^{\frac{-\alpha_{nm}^2 * \Delta D_{intra}}{R^2}}$$

$$B_{nm} = \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1 - (-1)^n \cos(\gamma G_{\parallel} \delta L)}{[(n\pi)^2 - (\gamma G_{\parallel} \delta L')^2]^2} * e^{\frac{-n^2 \pi^2 * \Delta D_{intra}}{(L')^2}}$$

$$G_{\perp} = G * \sin(\theta)$$

$$G_{\parallel} = G * \cos(\theta)$$

J_n est la fonction de Bessel de première espèce d'ordre n et α_{nm} est la $m^{ième}$ racine positive de l'équation de Bessel : $J'_n = 0$. δ_{nm} est le symbole de Kronecker. R est le rayon des cylindres et $L'=2L$. δ est la durée d'application des gradients de diffusion.

Le modèle des « corps cellulaires »

Dans ce modèle, les métabolites diffusent dans des sphères vides et imperméables de diamètre d (figure 2.1.2). L'atténuation du signal RMN est donnée par l'expression (Balinov et al., 1993 ; Linse and Söderman, 1995):

$$E(\delta, \Delta, G) = \frac{[3 * j_1(\gamma G_{max} \delta R)]^2}{(\gamma G_{max} \delta R)^2} + 6 * (\gamma G_{max} \delta R)^2 * C_{nm} \quad (2.2)$$

avec :

$$C_{nm} = \sum_{n=0}^{\infty} [j'_n(\gamma G_{max} \delta R)]^2 * \sum_{m=1}^{\infty} \frac{\alpha_{nm}^2}{(\alpha_{nm}^2 - n^2 - n) * [\alpha_{nm}^2 - (\gamma G_{max} \delta R)^2]^2} * e^{\frac{-\alpha_{nm}^2 * \Delta D_{intra}}{R^2}}$$

j_n est la fonction sphérique de Bessel de première espèce et α_{nm} est la $m^{ième}$ racine positive de l'équation de Bessel : $j'_n = 0$. R est le rayon des sphères.

Dans les deux modèles, D_{intra} est le coefficient de diffusion intracellulaire. Il dépend du coefficient de diffusion libre D et de la tortuosité T induite par la présence des organelles et d'autres structures intracellulaires : $D_{intra} = D/T^2$. A partir des expressions 2.1 et 2.2, on peut étudier l'atténuation du signal pour différentes valeurs de R , L et D_{intra} en fonction b et Δ . Par analogie avec l'expression 1.27, l'ADC est calculé à partir de l'expression :

$$ADC = \frac{-\ln(E(\delta, \Delta, G))}{b} \quad (2.3)$$

2.1.2. Simulations sur Matlab pour déterminer la contribution des paramètres intracellulaires à la mesure de l'ADC

Dans un premier temps, nous avons fixé la longueur $L_0=100 \mu m$ et le diamètre $d_0=5 \mu m$ pour le modèle des « neurites » et le diamètre $d_0=50 \mu m$ pour le modèle des « corps cellulaires ». Pour les deux modèles, le coefficient de diffusion intracellulaire D_{intra}^0 est égal à $0.5 \mu m^2/ms$. Nous avons mesuré l'atténuation du signal pour différentes valeurs de b comprises entre $100 s/mm^2$ et $100000 s/mm^2$ pour $\Delta=100 ms$ puis pour différentes valeurs de Δ comprises entre $0.1 ms$ et $10 s$ pour $b=3000 s/mm^2$. Ensuite, nous avons augmenté successivement L_0 , d_0 , D_{intra}^0 de 10% et calculé à nouveau l'atténuation du signal pour chaque condition en fonction de b puis Δ .

2.1.3. Résultats et conclusion

La contribution de chaque paramètre physiologique à la variation du logarithme de l'atténuation du signal divisé par b ($\ln(E)/b$), c'est-à-dire la variation d'ADC, est estimée en fonction b puis Δ en divisant la variation absolue de $\ln(E)/b$ liée à une augmentation de 10% de L_0 , d_0 ou D_{intra}^0 par la somme de la variation absolue de tous les paramètres :

- contribution d'une augmentation de L_0 :

$$C_{L_0} = \frac{\left| \left(\frac{\ln(E)}{b} \right)_L - \left(\frac{\ln(E)}{b} \right)_{L_0} \right|}{\left| \left(\frac{\ln(E)}{b} \right)_L - \left(\frac{\ln(E)}{b} \right)_{L_0} \right| + \left| \left(\frac{\ln(E)}{b} \right)_d - \left(\frac{\ln(E)}{b} \right)_{d_0} \right| + \left| \left(\frac{\ln(E)}{b} \right)_{D_{intra}} - \left(\frac{\ln(E)}{b} \right)_{D_{intra}^0} \right|} \quad (2.4)$$

- contribution d'une augmentation de d_0 :

$$C_{d_0} = \frac{\left| \left(\frac{\ln(E)}{b} \right)_d - \left(\frac{\ln(E)}{b} \right)_{d_0} \right|}{\left| \left(\frac{\ln(E)}{b} \right)_L - \left(\frac{\ln(E)}{b} \right)_{L_0} \right| + \left| \left(\frac{\ln(E)}{b} \right)_d - \left(\frac{\ln(E)}{b} \right)_{d_0} \right| + \left| \left(\frac{\ln(E)}{b} \right)_{D_{intra}} - \left(\frac{\ln(E)}{b} \right)_{D_{intra}^0} \right|} \quad (2.5)$$

- contribution d'une augmentation de D_{intra}^0 :

$$C_{D_{intra}^0} = \frac{\left| \left(\frac{\ln(E)}{b} \right)_{D_{intra}} - \left(\frac{\ln(E)}{b} \right)_{D_{intra}^0} \right|}{\left| \left(\frac{\ln(E)}{b} \right)_L - \left(\frac{\ln(E)}{b} \right)_{L_0} \right| + \left| \left(\frac{\ln(E)}{b} \right)_d - \left(\frac{\ln(E)}{b} \right)_{d_0} \right| + \left| \left(\frac{\ln(E)}{b} \right)_{D_{intra}} - \left(\frac{\ln(E)}{b} \right)_{D_{intra}^0} \right|} \quad (2.6)$$

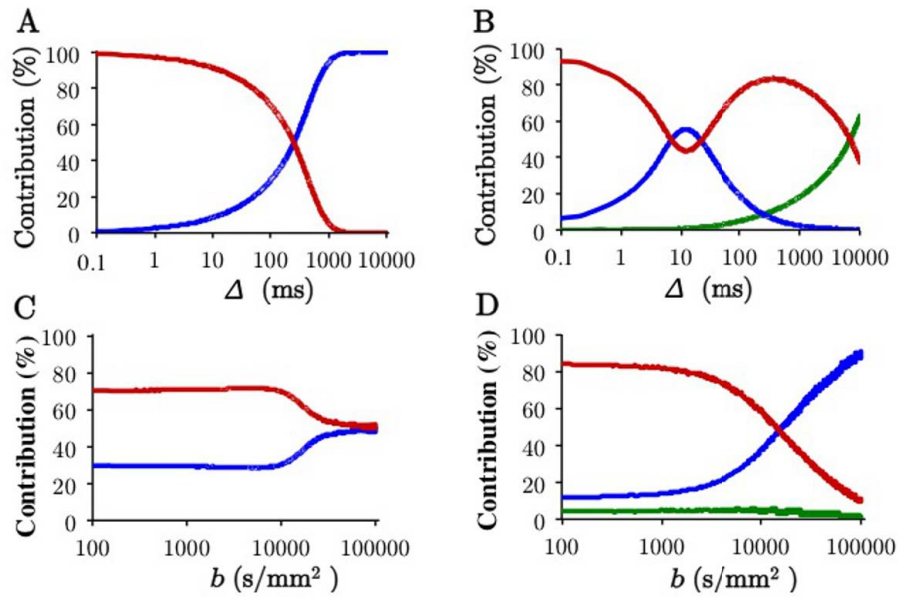


Figure 2.1.4 : Contribution de D_{intra} (rouge), d (bleu), L (vert) à la variation du logarithme de l'atténuation du signal divisé par b en fonction de Δ (A-B) et b (C-D) pour le modèle des « corps cellulaires » (A-C) et des « neurites » (B-D).

La figure 2.1.4 résume l'ensemble des résultats. Pour le modèle des « corps cellulaires », une variation du temps de diffusion Δ permet d'identifier clairement plusieurs domaines : quand Δ varie entre 0.1 et 10 ms, $\ln(E)/b$ dépend exclusivement de D_{intra} et si $\Delta > 1000$ ms, $\ln(E)/b$ dépend de d (figure 2.1.4-A). Au contraire, une variation de la pondération en diffusion b ne

permet pas de différencier les deux composantes (figure 2.1.4-C) : D_{intra} contribue majoritairement à la variation de $\ln(E)/b$ et la contribution de d reste significative mais minoritaire (entre 30 et 49% sur toute la gamme des valeurs de b). Pour le modèle des « neurites », on peut identifier plusieurs domaines lorsque Δ augmente : pour les temps de diffusion courts (<1 ms) seul D_{intra} contribue, pour des temps intermédiaires (10 ms) d devient un paramètre déterminant et pour des temps très longs (>1000 ms) la contribution de L devient de plus en plus significative (figure 2.1.4-B). Lorsque b varie, deux domaines peuvent être distingués : $\ln(E)/b$ dépend essentiellement de D_{intra} pour $b < 10000$ s/mm²) et dépend de d pour $b > 10000$ s/mm². Au contraire, $\ln(E)/b$ ne dépend jamais significativement de L (figure 2.1.4-D).

Par conséquent, pour les deux modèles et les paramètres étudiés ici, l'étude de la variation du logarithme de l'atténuation du signal divisé par b en fonction de Δ permet de différencier la contribution des paramètres biophysiques. A l'opposé, la contribution de chaque paramètre est difficile à définir lors d'une variation seule de b . Ces simulations suggèrent donc qu'une mesure de la diffusion intracellulaire sur une large gamme de temps de diffusion est plus efficace pour définir et estimer les paramètres définissant la microstructure à différentes échelles spatiales. C'est donc la stratégie que nous adapterons dans la suite de nos travaux.

2.2. Connaissances actuelles sur la dépendance de l'ADC au temps de diffusion

2.2.1. Mesure aux temps de diffusion courts

Pour des temps de diffusion très courts (entre 0.1 et 10 ms), l'ADC intracellulaire dépend principalement de D_{intra} , c'est-à-dire du coefficient de diffusion libre et de la tortuosité à très courte échelle (induite par la présence d'obstacles dans le milieu intracellulaire tels que les organelles ou microtubules). La mesure de l'ADC sur une plage de temps très courte est possible grâce à l'utilisation de gradients oscillants à modulation cosinusoidale (Marchadour et al., 2012). Avec un tel motif, la pondération en diffusion est augmentée en rallongeant la durée des gradients et le temps de diffusion est diminué en augmentant la fréquence des gradients. L'introduction des gradients oscillants à une séquence LASER (Localization by Adiabatic SElective Refocusing, Garwood and DelaBarre, 2001) a permis chez le rat sain de mesurer l'ADC de trois métabolites (tNAA, tCr et tCho) pour des temps de diffusion de 0.94, 1.24, 1.48, 1.9, 2.9 et 12.9 ms (figure 2.2.1). A partir de ces mesures et de modèles analytiques simples (proches de ceux décrits précédemment), la distance inter-obstacles (c.-à-d. la distance entre les organelles

et le diamètre des fibres ou des corps cellulaires), la tortuosité T et le coefficient de diffusion libre D ont pu être estimés par spectroscopie de diffusion (Marchadour et al., 2012). Le coefficient de diffusion libre pour les trois métabolites est de l'ordre de $0.55 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ (ce qui correspond à un cytoplasme 20% plus visqueux que l'eau libre), la distance entre deux obstacles est inférieure à $2 \mu\text{m}$ et la tortuosité est de 1.7 (ce qui signifie que la distance pour aller d'un point à un autre est 1.7 fois plus grande que si la molécule se déplaçait en ligne droite). Cette étude a également montré l'absence significative des transports actifs dans le cerveau du rat.

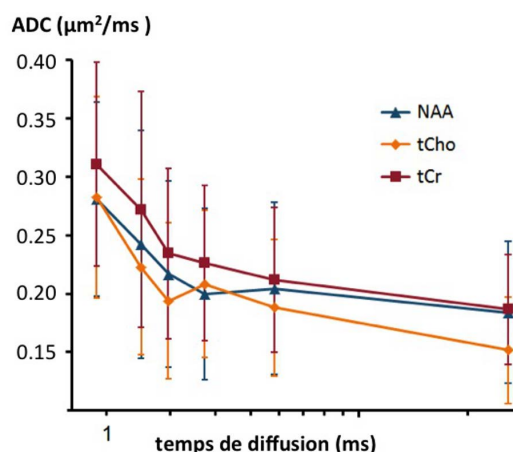


Figure 2.2.1 : Variation de l'ADC de trois métabolites en fonction du temps de diffusion dans un large voxel dans le cerveau de rat sain (figure extraite de Marchadour et al., 2012).

2.2.2. Mesure aux temps de diffusion longs

Pour des temps de diffusion longs (>10 - 100 ms selon les géométries considérées, figure 2.1.4), l'ADC intracellulaire dépend de la géométrie du compartiment dans lequel diffusent les métabolites (organelles, corps cellulaires, fibres). Les paramètres biophysiques qui influencent significativement la diffusion sont donc la taille et la géométrie des compartiments. Dans la littérature, l'ADC des métabolites a été mesuré dans le cerveau de différentes espèces (rat, macaque, Homme) mais toujours à un seul temps de diffusion. La figure 2.2.2 rassemble l'ensemble des données de la littérature. La dépendance de l'ADC au temps de diffusion à partir des données de la littérature (entre 13 ms (Dreher et al., 2001) et 242 ms (Branzoli et al., 2013)) n'est pas évidente. De plus, l'analyse est risquée étant donné les différences méthodologiques (séquence, temps d'écho, durée des gradients de diffusion), de champs magnétiques et inter-espèces. Caractériser la compartimentation des métabolites dans le milieu intracellulaire est une information importante pour répondre à des questions fondamentales sur la structure cellulaire, pour connaître les paramètres qui influencent l'ADC et comprendre les atteintes cellulaires dans

des situations pathologiques. C'est donc la question à laquelle nous tâcherons de répondre dans le chapitre suivant.

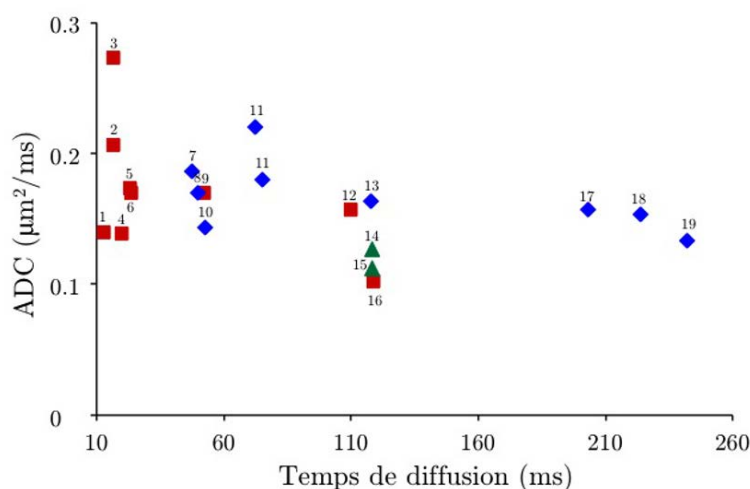


Figure 2.2.2 : Moyenne de l'ADC du tNAA, tCr et tCho chez le rat (rouge), le macaque (vert) et l'Homme (substance grise) (bleu) à partir de données trouvées dans la littérature en fonction du temps de diffusion. (1) Dreher et al., 2001, (2) Merboldt et al., 1993, (3) Wick et al., 1995, (4) de Graaf et al., 2001, (5) Dijkhuizen et al., 1999, (6) van der Toorn et al., 1996, (7) Harada et al., 2002, (8) Upadhyay et al., 2008, (9) Abe et al., 2000, (10) Kan et al., 2011, (11) Ellegood et al., 2011, (12) Hakumaki et al., 1998, (13) Ellegood et al., 2005, (14) Valette et al., 2005, (15) Valette et al., 2007, (16) Pfeuffer et al., 2000, (17) Ellegood et al., 2006, (18) Posse et al., 1993, (19) Branzoli et al., 2013.

2.3. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons montré par simulations que l'étude de la dépendance de l'ADC au temps de diffusion fournit une information plus spécifique sur la microstructure cellulaire à différentes échelles spatiales, en comparaison à l'étude de la dépendance de l'ADC au facteur de pondération b . Aux temps de diffusion courts, l'ADC reflète la viscosité intracellulaire. Puis, aux temps intermédiaires, il dépend essentiellement du diamètre des fibres et du corps cellulaire. Enfin, aux temps très longs, l'ADC est majoritairement défini par la longueur des fibres. On peut alors imaginer utiliser la spectroscopie RMN pondérée en diffusion pour mesurer un paramètre cellulaire particulier en condition physiologique et/ou pathologique en choisissant un temps de diffusion adapté. Pour une véritable quantification, la mesure de la dépendance de l'ADC au temps de diffusion devient nécessaire. Dans la littérature, cette dépendance a seulement été étudiée aux temps très courts dans le cerveau du rat (Marchadour et al., 2012) ou à des temps plus longs dans les muscles du rat (de Graaf et al., 2000). L'un des principaux travaux de cette

thèse a donc été de mesurer la dépendance de l'ADC aux temps longs afin d'étudier la compartimentation des métabolites dans les cellules du cerveau.

ÉTUDE DE LA COMPARTIMENTATION DES METABOLITES DANS LES NEURONES ET LES ASTROCYTES

Pour connaître la compartimentation des métabolites dans le milieu intracellulaire (tNAA et Glu dans les neurones et tCho et Ins dans les astrocytes), nous avons cherché à mesurer l'ADC des métabolites sur une large gamme de temps dans une espèce animale donnée et avec une séquence unique où un seul paramètre est ajusté : le temps de diffusion.

3.1. Séquence pour la diffusion aux temps longs

Les expériences ont été réalisées sur l'IRM 7 T Agilent (Palo Alto, CA, USA) de MIRCen, équipé de gradients pouvant atteindre une amplitude de 100 mT/m en 325 μ s sur chaque axe. Nous avons utilisé une antenne ^1H de surface en quadrature pour l'émission et la réception radiofréquence (Rapid Biomedical).

3.1.1. Schéma de la séquence

Les séquences pondérées en diffusion de référence sont les séquences PRESS (Point Resolved Spectroscopy) et STEAM (STimulated Echo Acquisition Mode). Dans la séquence STEAM, l'écho stimulé résulte de l'effet cumulé de trois impulsions $\pi/2$. La première impulsion permet de basculer l'aimantation dans le plan transverse. Le premier gradient de diffusion d'amplitude G et de durée δ déphase alors les spins. Chaque spin voit un champ magnétique différent et acquiert une phase différente. Après un délai $TE/2$, une deuxième impulsion bascule à nouveau l'aimantation. Celle-ci est alors stockée dans la direction longitudinale pendant un temps T_M , temps de mélange. Au cours de ce délai, les spins sont libres de se déplacer sous l'effet de la diffusion. La troisième impulsion ramène alors l'aimantation dans le plan transverse. Le deuxième gradient de diffusion permet enfin de rephaser les spins. Les spins immobiles sont rephasés parfaitement et les spins mobiles sont rephasés partiellement. Outre les gradients de diffusion, la séquence STEAM contient également des gradients de sélection de coupe permettant de définir le volume d'intérêt et des « crushers » éliminant les trois FID et les quatre

autres échos de spins produits par la séquence. Ces derniers induisent également une perte de signal d'un facteur 1/2 ce qui réduit significativement le signal-sur-bruit. Néanmoins, avec la séquence STEAM, une augmentation du temps de diffusion est possible en augmentant le temps de mélange tout en conservant le même temps d'écho TE et donc la même pondération T_2 et en augmentant seulement la pondération T_1 . Cette particularité représente un avantage majeur par rapport à la séquence PRESS où le temps de diffusion dépend du temps d'écho (pour des temps de diffusion longs, on a des temps d'écho longs et donc une perte de signal) (Nicolay et al., 2001). C'est pourquoi, nous avons utilisé la séquence STEAM pour notre étude (figure 3.1.1).

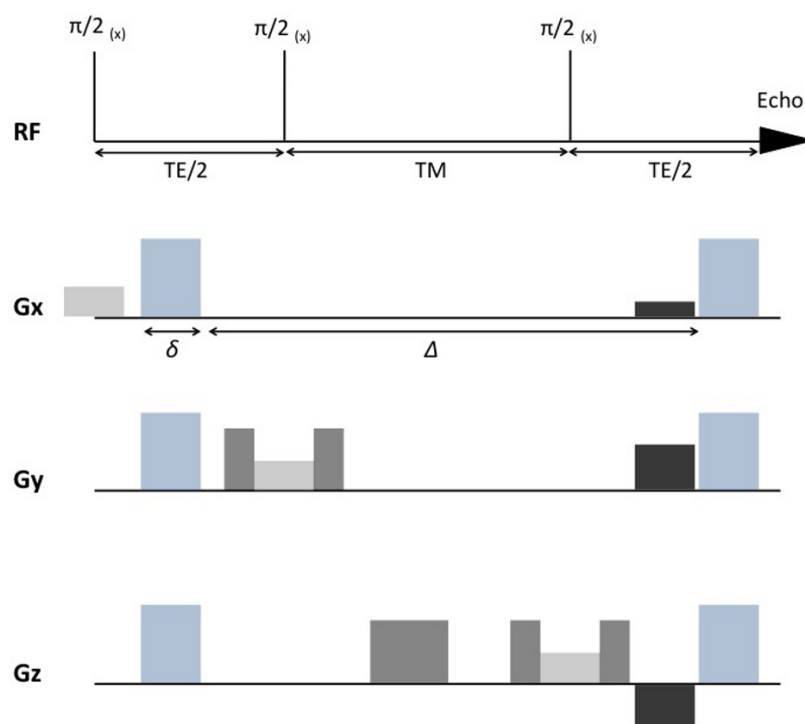


Figure 3.1.1 : Séquence STEAM pondérée en diffusion avec les gradients de localisation (gris clair), de refocalisation (noir), de crushers (gris foncé) et les gradients de diffusion (bleu).

La suppression du signal de l'eau (qui domine largement le signal des métabolites) est réalisée par un module VAPOR (VARIABLE Power RF Pulses with Optimized Relaxation delays, Tkac et al., 1999). Celui-ci comprend sept impulsions appliquées avant la séquence STEAM et une impulsion appliquée pendant le temps de mélange. La puissance des impulsions est optimisée avant chaque expérience pour s'assurer d'une suppression optimale du signal de l'eau. Enfin, pour améliorer la localisation et éviter une contamination par le signal extérieur au voxel, un module d'OVS (Outer Volume Suppression) comprenant dix impulsions de saturation (sécantes hyperboliques) avec des puissances croissantes a été ajouté entre le module VAPOR et la séquence STEAM.

Les spectres ont été acquis avec un temps d'écho TE=18 ms et un temps de répétition TR=2800 ms. Afin d'augmenter le rapport signal-sur-bruit, nous avons choisi d'utiliser un large voxel (18x18x18 mm³). Le shim a été préalablement ajusté à l'aide de FASTMAP (Gruetter, 1993). Les gradients de diffusion, d'une durée $\delta=5$ ms, sont appliqués sur les trois axes (x, y et z) simultanément.

3.1.2. Coefficient de pondération en diffusion et correction des termes croisés

A partir de l'expression 1.20, on peut calculer le coefficient de pondération en diffusion pour la séquence STEAM. Si les gradients de diffusion sont rectangulaires et la contribution des gradients de sélection de coupe et de refocalisation et les crushers est négligée alors on a :

$$b = \gamma^2 G^2 \delta^2 t_d \quad (3.1)$$

$$\text{avec } G^2 = G_x^2 + G_y^2 + G_z^2, t_d = \Delta - \frac{\delta}{3} \text{ et } \Delta \sim TE + TM - \delta$$

Cependant, pour les temps de diffusion longs et une valeur de b constante, l'amplitude des gradients de diffusion devient faible et la contribution des autres gradients de la séquence (G_{im}) mais aussi les gradients induits par les inhomogénéités de champ magnétique ou les différences de susceptibilité magnétique (G_0) devient importante (termes croisés) (Neeman et al., 1990 ; Zhong et al., 1991):

$$b \propto G^2 + G * (G_{im} + G_0) \quad (3.2)$$

Négliger les termes croisés aux temps de diffusion longs (>100 ms) conduit à une surestimation de l'ADC. Afin de corriger cet effet, il est possible d'acquérir les spectres pondérés en diffusion avec des gradients de diffusion positifs (S_+) puis négatifs (S_-) et de calculer la moyenne géométrique du signal mesuré dans chaque condition (Neeman et al., 1991 ; Jara and Wehrli, 1994). Pour des petites valeurs de b , on peut utiliser l'expression 1.27 (approximation gaussienne, modèle mono-exponentiel) pour l'atténuation du signal, soit :

$$\frac{S_+}{S_0} = \exp(-b_+ * ADC) \text{ avec } b_+ \propto G^2 + G * (G_{im} + G_0) \quad (3.3)$$

$$\frac{S_-}{S_0} = \exp(-b_- * ADC) \text{ avec } b_- \propto G^2 - G * (G_{im} + G_0) \quad (3.4)$$

$$ADC = \frac{1}{b} * \ln \left(\frac{\sqrt{S_+ * S_-}}{S_0} \right) \quad (3.5)$$

En pratique, seuls les termes croisés générés par les gradients constants dans l'espace sont corrigés, c.-à-d. les gradients d'imagerie et certains gradients liés aux inhomogénéités de champ magnétique. La mesure d'ADC reste donc potentiellement biaisée par des inhomogénéités (différence de susceptibilité magnétique) qui varient spatialement à l'échelle microscopique. Cependant, il est probable que leur contribution reste minoritaire (chapitre 6).

Une autre solution consiste à acquérir les spectres de diffusion avec une seule polarité et à définir l'expression exacte des termes croisés pour chaque temps de diffusion à partir de l'équation 1.20 et du schéma de la séquence (figure 3.1.1). Cependant, cette technique ne permet pas de corriger l'effet du terme croisé GG_0 puisque G_0 n'est pas connu (même s'il est en théorie minimal après le shim). De plus, il est difficile de connaître exactement la forme du gradient pendant la montée et la descente, ce qui rend très difficile tout calcul rigoureusement exact de b .

3.1.3. Validation *in vitro*

Nous avons validé cette approche *in vitro* à l'aide d'un fantôme d'agarose ($c_{agar} = 3\%$). Nous avons acquis des spectres de l'eau (TR/TE=2800/18 ms) avec deux valeurs de b (0 et 1000 s/mm²), cinq valeurs de TM (75, 250, 500, 750 et 1000 ms) et deux polarités pour les gradients de diffusion (positive et négative). Pour chaque condition, le signal de l'eau correspond à l'aire sous le pic de la résonance de l'eau. L'ADC est mesuré à partir de l'expression 1.27 où S correspond au signal de l'eau avec les gradients positifs, les gradients négatifs ou la moyenne géométrique du signal obtenu pour les deux polarités (expression 3.5). Enfin, pour tester la puissance de cette approche pour corriger l'effet des termes croisés dus aux inhomogénéités de champ magnétique, nous avons répété le même protocole avec un fantôme d'agarose ($c_{agar} = 3\%$) contenant des particules de fer ($c_{fer} = 0.1$ mM). Les particules de fer permettent de créer des micro-inhomogénéités de champ magnétique.

La figure 3.1.2 regroupe l'ensemble des résultats. Quand le temps de diffusion augmente, l'ADC mesuré avec les gradients positifs (ADC₊) augmente alors que l'ADC mesuré avec les gradients négatifs (ADC₋) diminue. Au temps de diffusion le plus long, ADC₊ \gg ADC₋ démontrant ainsi l'importance des termes croisés et du biais sur la mesure s'ils sont négligés. En calculant la moyenne géométrique, l'ADC devient indépendant du temps de diffusion pour les deux fantômes (avec et sans particules de fer). La valeur de l'ADC est environ 2.1 $\mu\text{m}^2/\text{ms}$, proche du coefficient de diffusion de l'eau libre à 20°. Ces résultats montrent que les biais sur la mesure d'ADC sont principalement liés aux termes croisés entre les gradients de diffusion et les gradients d'imagerie de la séquence et qu'ils peuvent être compensés en inversant la polarité des

gradients de diffusion et en calculant la moyenne géométrique du signal obtenu pour les deux conditions. C'est donc cette approche que nous utiliserons dans notre étude *in vivo*.

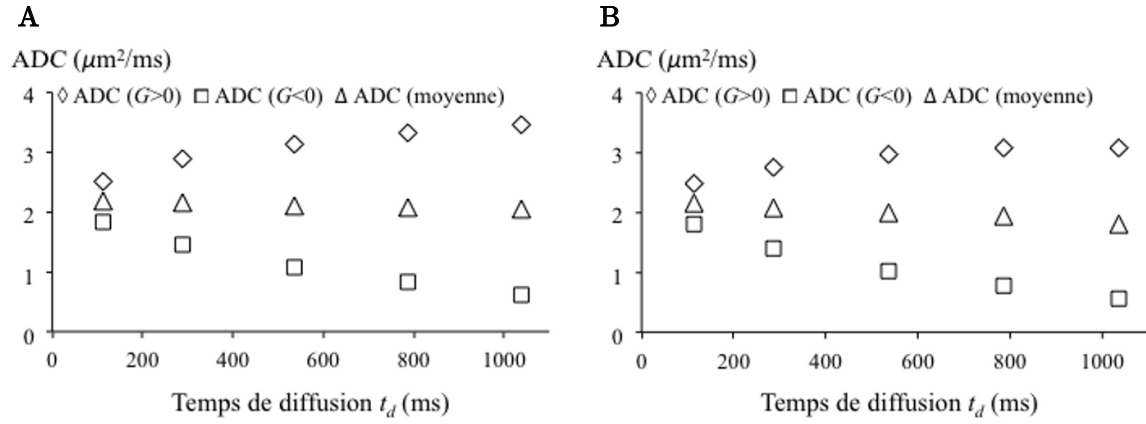


Figure 3.1.2 : Effet des termes croisés sur la mesure du coefficient de diffusion de l'eau dans (A) un fantôme d'agarose ($c_{\text{agar}} = 3\%$) et (B) un fantôme d'agarose contenant des particules de fer.

3.2. Mesure de l'ADC *in vivo*

3.2.1. Protocole expérimental

Les expériences ont été réalisées sur six macaques sains à jeun (*macaca fascicularis*, poids 4-6 kg). Les animaux ont d'abord été anesthésiés avec une injection intramusculaire de kétamine-xylazine (0.7 mL). L'anesthésie a ensuite été maintenue par une perfusion intravasculaire de propofol tout au long de l'expérience. Les animaux ont été intubés, ventilés avec un mélange 55:45 d'air et d'oxygène et positionnés dans un cadre stéréotaxique en position du « sphinx » (couchés sur le ventre et maintenus par des barres d'oreilles et un mors). La température corporelle a été maintenue à température physiologique constante ($36 \pm 1^\circ$). Les constantes physiologiques ont été suivies tout au long des expériences à l'aide d'un système de monitoring Maglife (Schiller Medical SA, Wissembourg, France). Les paramètres enregistrés sont restés relativement stables : pressions systolique/diastolique $78 \pm 7/29 \pm 9$ mmHg, rythme cardiaque/respiratoire $83 \pm 8/16 \pm 1$ min⁻¹, pression CO₂ expiré 37 ± 4 mmHg.

Les spectres ont été acquis dans un large voxel positionné dans le lobe fronto-pariétal à l'aide d'une image « scout » ou image de localisation (figure 3.2.1). Le voxel d'intérêt contient une quantité similaire de substance blanche et de substance grise. Les spectres localisés des métabolites ont été acquis à cinq temps de diffusion ($t_d=86, 361, 511, 661$ et 1011 ms obtenus en variant le temps de mélange TM entre 75 et 1000 ms) et pour deux valeurs de b (0 et 3000 s/mm²). L'amplitude G des gradients de diffusion est alors différente pour chaque temps de

diffusion ($G=81, 39, 33, 29$ et 24 mT/m). Pour compenser la diminution du SNR quand t_d augmente, les spectres à $t_d=1011$ ms ont été acquis avec un nombre de répétitions double (soit 128 répétitions à $t_d=86, 361, 511$ et 661 ms et 256 répétitions à $t_d=1011$ ms). Pour chaque valeur de t_d , b et polarité de gradients, des spectres de l'eau (séquence identique sans module VAPOR) ont été acquis pour corriger l'artéfact lié à la présence des courants de Foucault sur les spectres des métabolites (Klose, 1990). Enfin, à temps d'écho court, le signal des macromolécules (MM) contamine le signal des métabolites, modifie la ligne de base et entraîne une sous-estimation de l'ADC. Un spectre des MM a alors été acquis à chaque expérience pour les quatre premières valeurs de t_d à $b=0$ s/mm² en ajoutant une impulsion d'inversion (TI=590 ms, 256 répétitions) au début de la séquence STEAM. A $t_d=1011$ ms, le signal des MM disparaît à cause de la forte pondération T_1 .

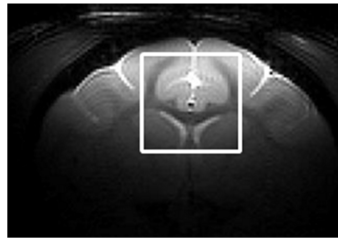


Figure 3.2.1 : Position du voxel ($18 \times 18 \times 18$ mm³) dans le lobe fronto-pariétal du cerveau d'un macaque

3.2.2. Traitement des données

Le traitement des données a été réalisé avec Matlab (The Mathworks, Natick, MA, USA). Pour chaque valeur de t_d , b et polarité de gradients, les spectres individuels ont été corrigés en phase et en fréquence avant d'être sommés. Les courants de Foucault ont été corrigés en utilisant le spectre de référence de l'eau correspondant et le spectre des macromolécules a été soustrait au spectre des métabolites. L'analyse des spectres a ensuite été effectuée avec LCModel (Provencher, 1993) en utilisant une base différente pour chaque t_d et générée sous Matlab par simulation de l'évolution de la matrice de l'opérateur densité. Les métabolites inclus dans la modélisation sont : le NAA total (tNAA=NAA+NAAG), la créatine totale (tCr=Cr+PCr), les composés choline (tCho=Cho+PCho+GPC), le glutamate (Glu), le myo-inositol (Ins), la glutamine (Gln), le GABA, le lactate (Lac), l'alanine (Ala), la taurine (Tau), le glutathion (GSH) et le glucose (Glc). Seuls les métabolites avec un Cramér-Rao Lower Bound (CRLB, erreur sur la valeur absolue de la concentration indiquée par LCModel) inférieur à 5% sont retenus pour l'analyse: tNAA, tCr, tCho, Glu et Ins. L'ADC des métabolites est calculé à partir de l'expression 3.5.

3.2.3. Résultats

La figure 3.2.2 illustre la qualité des spectres obtenus. Au temps de diffusion le plus long, le SNR est suffisamment bon pour pouvoir quantifier le signal des cinq métabolites tandis qu'aux temps de diffusion les plus courts, le signal des MM est correctement soustrait minimisant ainsi la contamination du signal des métabolites et le biais sur la quantification de l'ADC.

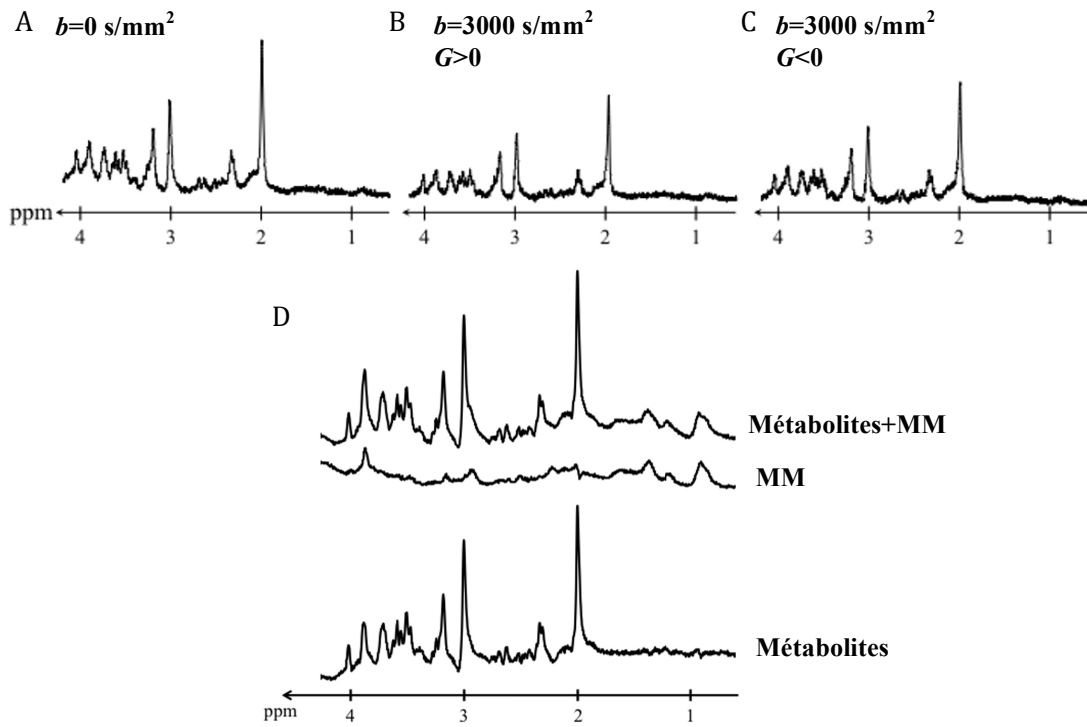


Figure 3.2.2 : Spectres acquis lors d'une expérience à $t_d = 1011$ ms avec $b = 0$ s/mm² (A), $b = 3000$ s/mm² et $G > 0$ (B) et $b = 3000$ s/mm² et $G < 0$ (C). Soustraction des MM d'un spectre acquis à $b = 0$ s/mm² à $t_d = 86$ ms (D).

La table 3.2.1 résume les valeurs d'ADC moyennées sur l'ensemble des acquisitions pour chaque t_d (N=5 à $t_d = 86, 361$ et 1011 ms et N=4 à $t_d = 511$ et 661 ms). L'ADC des cinq métabolites et de l'eau (calculé à partir des spectres sans suppression de l'eau) ne dépend pas significativement du temps de diffusion. L'ADC de chaque métabolite et de l'eau, moyenné sur toutes les acquisitions et toutes les valeurs de t_d , est égal à : $ADC_{eau} = 0.61 \pm 0.02$ $\mu\text{m}^2/\text{ms}$, $ADC_{tNAA} = 0.11 \pm 0.01$ $\mu\text{m}^2/\text{ms}$, $ADC_{tCr} = 0.12 \pm 0.01$ $\mu\text{m}^2/\text{ms}$, $ADC_{tCho} = 0.09 \pm 0.01$ $\mu\text{m}^2/\text{ms}$, $ADC_{Glu} = 0.12 \pm 0.01$ $\mu\text{m}^2/\text{ms}$, $ADC_{Ins} = 0.10 \pm 0.01$ $\mu\text{m}^2/\text{ms}$. La faible déviation standard (< 0.015 $\mu\text{m}^2/\text{ms}$) montre que la mesure de l'ADC est très reproductible. Les valeurs d'ADC sont proches des valeurs de la littérature dans le cerveau du macaque, à l'exception du glutamate et du myo-inositol dont les valeurs trouvées

ici sont plus faibles (Valette et al., 2005 ; Valette et al., 2007). Cette différence peut s'expliquer par une plus faible sensibilité dans les études de la littérature réalisées à 3 T.

	ADC ($\mu\text{m}^2/\text{ms}$) $t_d=86$ ms	ADC ($\mu\text{m}^2/\text{ms}$) $t_d=361$ ms	ADC ($\mu\text{m}^2/\text{ms}$) $t_d=511$ ms	ADC ($\mu\text{m}^2/\text{ms}$) $t_d=661$ ms	ADC ($\mu\text{m}^2/\text{ms}$) $t_d=1011$ ms
tNAA	0.121 \pm 0.009	0.121 \pm 0.007	0.121 \pm 0.005	0.111 \pm 0.007	0.100 \pm 0.005
tCr	0.133 \pm 0.007	0.118 \pm 0.005	0.116 \pm 0.009	0.111 \pm 0.004	0.111 \pm 0.005
tCho	0.104 \pm 0.014	0.090 \pm 0.007	0.087 \pm 0.006	0.084 \pm 0.014	0.077 \pm 0.012
Glu	0.126 \pm 0.009	0.119 \pm 0.013	0.127 \pm 0.003	0.115 \pm 0.005	0.117 \pm 0.007
Ins	0.103 \pm 0.006	0.097 \pm 0.004	0.100 \pm 0.004	0.097 \pm 0.009	0.082 \pm 0.010

Table 3.2.1 : ADC des métabolites mesurés pour chaque t_d (moyenne \pm s.d., $N=5$ à $t_d=86, 361$ et 1011 ms et $N=4$ à $t_d=511$ et 661 ms).

3.2.4. Discussion

Validation de la mesure à deux valeurs de b

Au cours d'une expérience supplémentaire, nous avons mesuré dans le cerveau du macaque le signal des métabolites avec plusieurs valeurs de b (0, 1000, 2000, 3000 et 4000 s/mm²) à $t_d=1011$ ms et avec les deux polarités pour les gradients de diffusion. La variation du logarithme de l'atténuation du signal en fonction de b pour $G>0$, $G<0$ et la moyenne géométrique est représentée sur la figure 3.2.3. On observe une différence entre le logarithme de l'atténuation du signal pour $G>0$ et $G<0$ liée au biais introduit par les termes croisés. Quand on calcule la moyenne géométrique du signal mesuré avec les deux polarités, le logarithme de l'atténuation du signal varie linéairement avec b ($R^2>0.96$ pour les cinq métabolites). Les valeurs d'ADC mesurées par régression linéaire sont proches des valeurs obtenues avec deux valeurs de b (0 et 3000 s/mm², table 3.2.2). Ces résultats démontrent que nous sommes dans la limite des petites valeurs de b , où l'approximation de la diffusion gaussienne est valide et le logarithme de l'atténuation du signal est bien linéaire. La mesure de l'ADC des métabolites avec seulement deux valeurs de b n'est donc pas biaisée.

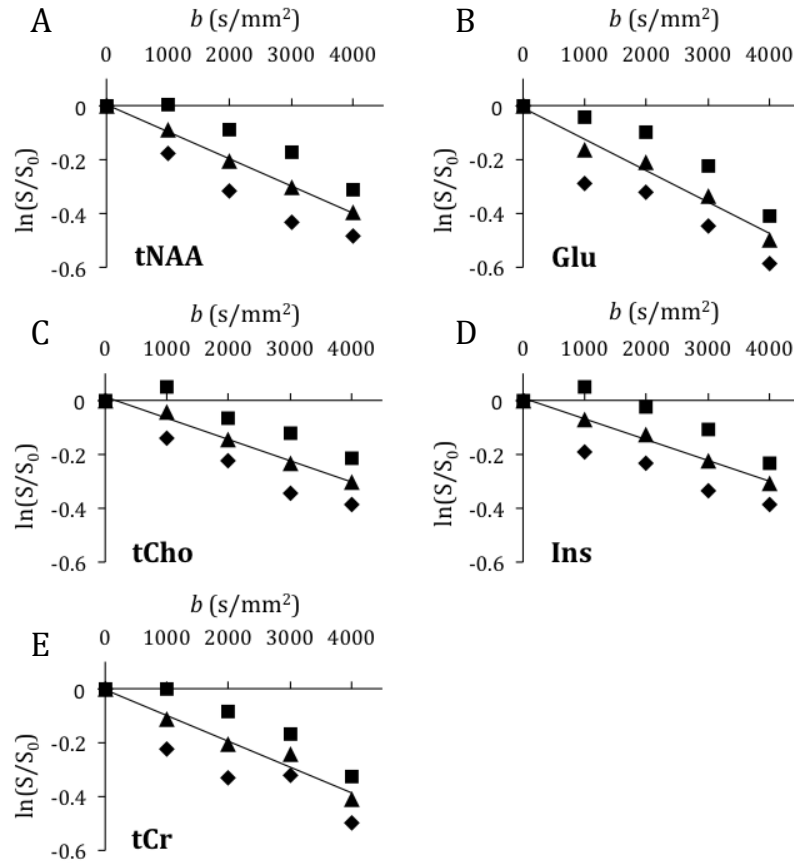


Figure 3.2.3 : (A-E) Variation du logarithme de l'atténuation du signal des métabolites en fonction de b à $t_d=1011$ ms pour $G>0$ (triangle), $G<0$ (carré) et la moyenne géométrique des deux polarités (triangle). La droite représente la régression linéaire du logarithme de l'atténuation du signal des métabolites mesuré à partir de la moyenne géométrique.

	tNAA	tCr	tCho	Glu	Ins
ADC ($\mu\text{m}^2/\text{ms}$)	0.1006	0.0959	0.0790	0.1163	0.0770
R^2	0.9986	0.9676	0.9894	0.9741	0.9925

Table 3.2.2: ADC ($\mu\text{m}^2/\text{ms}$) et R^2 obtenus par régression linéaire pour chaque métabolite.

Stabilité du coefficient de diffusion des métabolites

Lorsque le temps de diffusion augmente, la distance parcourue par les métabolites augmente. La taille de la cellule et sa géométrie influencent alors de plus en plus le déplacement des métabolites. Dans notre étude, nous avons observé que l'ADC des cinq métabolites ne dépend pas du temps de diffusion sur notre gamme de t_d . La stabilité de l'ADC, à une valeur non nulle, suggère que la diffusion des métabolites est caractéristique d'une composante de diffusion « libre » (aucun nouvel obstacle sur notre gamme de t_d). Pour caractériser cette composante, nous avons utilisé des modèles analytiques mimant la diffusion des métabolites.

3.3. Modélisation des données *in vivo*

In vivo, notre voxel d'intérêt contient un grand nombre de cellules. Afin d'extraire des informations sur la structure (taille et géométrie) des compartiments dans lesquels les métabolites diffusent, nous avons utilisé des modèles analytiques simples: le modèle des « neurites » et le modèle des « corps cellulaires » décrits au chapitre 2. Notons que ce nom de modèle de « corps cellulaires » est historique : en réalité il serait plus juste de le nommer « modèle restreint » puisqu'il est pertinent pour décrire la restriction non seulement dans les corps cellulaires mais également dans des organelles telles que noyaux, mitochondries, etc.

3.3.1. Simplification du modèle des « neurites »

Afin de limiter le nombre de paramètres à ajuster lors de la modélisation de nos données expérimentales, le modèle des « neurites » a été simplifié : on considère que sur notre gamme de t_d , les métabolites n'ont pas suffisamment de temps pour diffuser jusqu'à l'extrémité des fibres. Les fibres sont alors modélisées par des cylindres infinis de diamètre d . L'expression 2.1 est alors modifiée (Balinov et al., 1993 ; Linse and Söderman, 1995):

$$E(\delta, \Delta, G) = \left\{ \frac{[2 * J_1(\gamma G_{\perp} \delta R)]^2}{(\gamma G_{\perp} \delta R)^2} + 8 * (\gamma G_{\perp} \delta R)^2 * A_{nm} \right\} * e^{-\gamma^2 \delta^2 G_{\parallel}^2 \Delta D_{intra}} \quad (3.6)$$

avec :

$$A_{nm} = \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{1 + \delta_{n0}} * [J'_n(\gamma G_{\perp} \delta R)]^2 * \sum_{m=1}^{\infty} \frac{\alpha_{nm}^2}{(\alpha_{nm}^2 - n^2) * [\alpha_{nm}^2 - (\gamma G_{\perp} \delta R)^2]^2} * e^{\frac{-\alpha_{nm}^2 * \Delta D_{intra}}{R^2}}$$

$$G_{\perp} = G * \sin(\theta)$$

$$G_{\parallel} = G * \cos(\theta)$$

J_n est la fonction de Bessel de première espèce d'ordre n et α_{nm} est la $m^{ième}$ racine positive de l'équation de Bessel : $J'_n = 0$. δ_{nm} est le symbole de Kronecker. R est le rayon des cylindres.

Pour un ensemble de cylindres de longueurs infinies et orientés isotropiquement dans les trois directions de l'espace, l'ADC décroît de D_{intra} à $D_{intra}/3$ quand t_d augmente. A l'opposé, pour le modèle des « corps cellulaires » (chapitre 2), la diffusion est restreinte dans toutes les directions. Par conséquent, l'ADC tend vers 0 quand t_d augmente. La vitesse de décroissance de l'ADC dans les deux modèles dépend de d : plus d est petit plus l'ADC diminue rapidement.

3.3.2. Ajustement des données

Lors de la modélisation des données expérimentales, deux paramètres ont été ajustés : le coefficient de diffusion « libre » intracellulaire D_{intra} (qui dépend *a priori* de la tortuosité intracellulaire à courte échelle, en plus de la viscosité et de l'encombrement intracellulaire) et le diamètre des cylindres et des sphères. Une régression des moindres carrés non linéaire a été utilisée pour estimer les paramètres D_{intra} et d qui reflètent la diffusion des métabolites dans notre voxel. L'erreur sur l'ajustement des données a été estimée à l'aide d'une approche de Monte Carlo : (1) la déviation standard de la différence entre les données expérimentales et le meilleur ajustement des données est calculée, (2) un bruit aléatoire est généré avec la même déviation standard et est ajouté au meilleur ajustement pour créer un nouveau jeu de données qui (3) est à son tour analysé avec les deux modèles. Cette opération a été répétée 1000 fois. Pour chaque ajustement, une limite inférieure sur D_{intra} a été fixée à 2.5 fois la valeur minimale de l'ADC mesurée *in vivo* sur notre gamme de t_d pour chaque métabolite pour le modèle des « neurites ». Ceci oblige le modèle à ne pas converger vers une solution avec un D_{intra} très faible et donc un d très grand (plusieurs dizaines de μm), ce qui n'aurait pas de sens pour un modèle de fibres.

3.3.3. Résultats de la modélisation

La figure 3.3.1 montre que les deux modèles sont capables d'ajuster les données expérimentales. Les valeurs de D_{intra} et d trouvées pour chaque métabolite avec les deux modèles sont rapportées dans la table 3.3.1. En moyennant les résultats obtenus pour les cinq métabolites on obtient $D_{intra}=0.35\pm0.06 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ et $d=5\pm1 \mu\text{m}$ pour le modèle des « neurites » et $D_{intra}=0.13\pm0.01 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ et $d=104\pm48 \mu\text{m}$ pour le modèle des « corps cellulaires ».

	Modèle des « neurites »		Modèle des « corps cellulaires »	
	$D_{intra} (\mu\text{m}^2/\text{ms})$	$d (\mu\text{m})$	$D_{intra} (\mu\text{m}^2/\text{ms})$	$d (\mu\text{m})$
tNAA	0.381	4.7	0.134	97
tCr	0.377	6.5	0.138	93
tCho	0.262	6.9	0.113	59
Glu	0.408	4.0	0.130	186
Ins	0.305	4.9	0.113	84

Table 3.3.1 : D_{intra} et d obtenus avec les deux modèles pour les cinq métabolites.

Les résultats de l'analyse de Monte Carlo sont résumés dans la table 3.3.2. Les valeurs moyennes de D_{intra} et d obtenues sont très proches des valeurs trouvées par le meilleur ajustement (table 3.3.1), à l'exception du glutamate pour lequel la valeur de d pour le modèle des « corps cellulaires » est multipliée par un facteur 1.5. Les erreurs estimées à partir des résultats de l'analyse Monte Carlo (écart-type sur les 1000 répétitions) sont très petites pour D_{intra} pour les deux modèles et pour d pour le modèle des « neurites ». Pour le modèle des « corps cellulaires », l'erreur sur la détermination de d est importante. C'est pourquoi, nous avons également défini $d_{95\%}$, le cinquième centile (ce qui signifie que 95% des valeurs de d obtenues avec l'analyse de Monte Carlo sont supérieures ou égales à $d_{95\%}$).

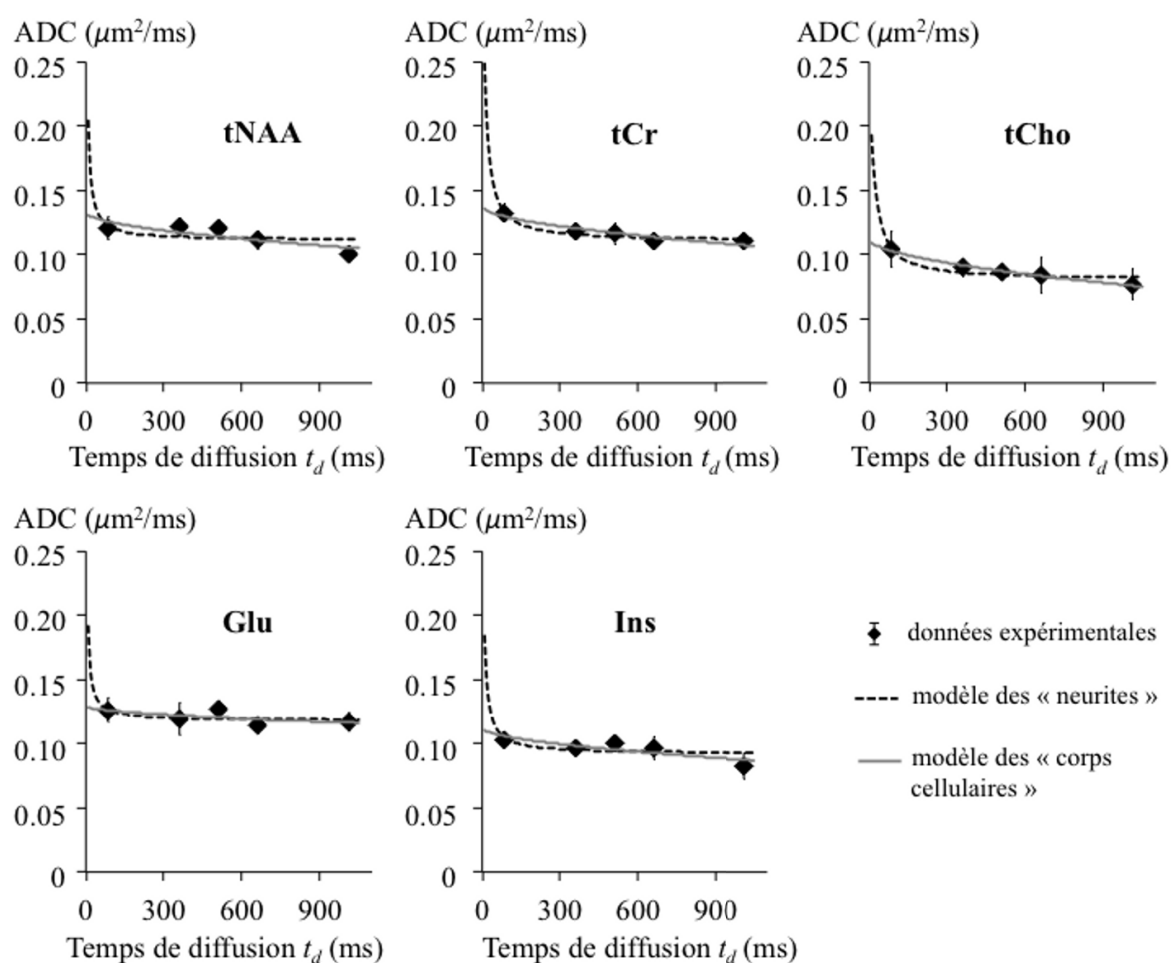


Figure 3.3.1 : ADC des cinq métabolites mesuré à cinq temps de diffusion ($t_d=86, 361, 511, 661$ et 1011 ms) et moyenné sur l'ensemble des acquisitions (losange noir) et meilleur ajustement obtenu avec le modèle des « neurites » (ligne pointillée) et le modèle des « corps cellulaires » (ligne pleine).

	Modèle des « neurites »		Modèle des « corps cellulaires »		
	D_{intra} ($\mu\text{m}^2/\text{ms}$)	d (μm)	D_{intra} ($\mu\text{m}^2/\text{ms}$)	d (μm)	$d_{95\%}$ (μm)
tNAA	0.380±0.020	4.2±2.3	0.134±0.007	111±59	70
tCr	0.377±0.005	6.5±0.4	0.138±0.004	96±15	76
tCho	0.262±0.008	6.9±0.7	0.113±0.002	59±2	55
Glu	0.408±0.011	3.8±1.5	0.130±0.005	260±203	107
Ins	0.305±0.015	4.7±1.8	0.113±0.006	91±37	62

Table 3.3.2 : D_{intra} et d obtenus avec l'analyse de Monte Carlo pour les cinq métabolites (moyenne±s.d. sur les 1000 répétitions). Pour le modèle des « corps cellulaires », nous avons déterminé la borne $d_{95\%}$ pour laquelle 95% des valeurs trouvées par l'analyse de Monte Carlo sont au dessus.

3.3.4. Discussion

La stabilité de l'ADC sur la gamme de t_d considérée dans notre étude, qui est synonyme d'une composante de diffusion « libre », résulte:

- soit de la diffusion des métabolites dans des fibres (prolongements astrocytaires, dendrites, axones) très fines ($d \sim 5 \mu\text{m}$) : la restriction est très importante dans la direction perpendiculaire à l'axe des fibres ($\text{ADC}_\perp \sim 0$ à tous les t_d) tandis que la diffusion dans la direction parallèle à l'axe des fibres est « libre ». Le diamètre des fibres est cohérent avec les données de la littérature où le diamètre des astrocytes est de l'ordre de 2-3 μm (Oberheim et al., 2008 ; Sun et al., 2010) et celui des neurones est compris entre 0.2 et 20 μm (Perge et al., 2009). La valeur de D_{intra} obtenue avec le modèle des « neurites » ($0.35 \pm 0.06 \mu\text{m}^2/\text{ms}$) est proche des valeurs de l'ADC dans la direction parallèle à l'axe des fibres rapportées dans la littérature (0.22 - $0.41 \mu\text{m}^2/\text{ms}$) pour les métabolites dans la substance blanche du cerveau de l'Homme (Kroenke et al., 2004 ; Upadhyay et al., 2007 ; Ronen et al., 2013). Néanmoins, le modèle des « neurites » ne permet pas de déterminer précisément d . Pour cela, il est nécessaire de considérer les temps de diffusion courts ($< 60 \text{ ms}$) de manière à observer la courbure de l'ADC (figure 3.3.2-A).
- soit de la diffusion dans des corps cellulaires très larges ($d \sim 100 \mu\text{m}$) : les parois de la cellule sont suffisamment éloignées et ne restreignent pas la diffusion des métabolites (même à $t_d \sim 1 \text{ s}$). Cependant, ces valeurs de d ne sont pas réalistes (sauf cas des neurones pyramidaux dont le corps cellulaire est plus large, mais ces derniers ne représentent pas la majorité des cellules cérébrales). Si on impose un diamètre plus raisonnable (c.-à-d. $d=50$, 25 ou 10 μm) et que seul D_{intra} est ajusté alors le modèle n'est pas capable d'expliquer la stabilité des données expérimentales (figure 3.3.2-B).

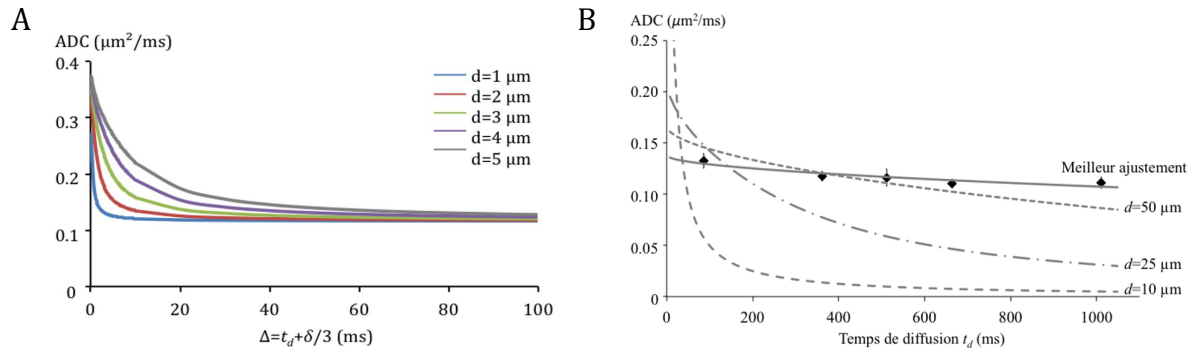


Figure 3.3.2 : (A) ADC simulé pour différentes valeurs de d avec le modèle des « neurites ». (B) Modélisation de l'ADC de la tCr (losange) avec le modèle des « corps cellulaires ». Le meilleur ajustement (ligne pleine) donne un diamètre d très large et irréaliste (94 μm). En imposant des valeurs de d plus raisonnables ($d=50$, 25 ou 10 μm) et en ajustant uniquement D_{intra} , le modèle n'est pas capable d'ajuster les données.

Ces résultats suggèrent que dans le voxel considéré, contenant un mélange équivalent de substance grise et de substance blanche, la majorité des métabolites diffuse dans de longues fibres. De plus, les métabolites sont compartimentés dans des cellules différentes : tNAA et Glu dans les neurones et tCho et Ins dans les astrocytes. Nos résultats suggèrent donc que la diffusion des métabolites dans les neurones et les astrocytes est similaire sur la gamme de t_d considérée. La diffusion majoritaire des métabolites dans les fibres est compatible avec un volume intracellulaire des fibres plus important que celui des corps cellulaires, ou une concentration des métabolites plus importante dans les fibres neuronales et astrocytaires (ce qui est peu probable puisque les concentrations tendent normalement à s'équilibrer rapidement au vu des valeurs des coefficients de diffusion). Dans la littérature, très peu d'études se sont attachées à la mesure de la fraction volumique des fibres et des corps cellulaires. Dans le cerveau de souris *ex vivo*, Chvátal et al. ont mesuré, par microscopie confocale, la fraction volumique intracellulaire des fibres (~85%) et des corps cellulaires (~15%) dans les astrocytes (Chvátal et al., 2007). D'autres études ont montré que la fraction volumique des corps cellulaires représentent ~15% du volume total (intra et extracellulaire) dans le cerveau du babouin *ex vivo* en utilisant une coloration de Nissl (Sherwood and Bassar, 2004) et dans le cerveau de souris par microscopie électronique (Chklovskii et al., 2002). Si on considère que la fraction volumique extracellulaire représente ~20% du volume total, alors ces études suggèrent que les fibres occupent ~65% du volume intracellulaire. Ces résultats sont également en accord avec la fraction volumique des fibres neuronales (~65%) mesurée dans le cerveau fixé du babouin à partir d'images obtenues par IRM pondérée en diffusion et de modèles analytiques (Jespersen et al., 2007). Nos observations sont donc cohérentes avec les valeurs de la littérature suggérant

que la fraction volumique des fibres neuronales et astrocytaires est bien plus importante que la fraction volumique des corps cellulaires.

3.4. Conclusion

La mesure du coefficient de diffusion aux temps de diffusion longs (jusqu'à ~ 1 s) nous a permis d'étudier la compartimentation des métabolites dans les cellules du cerveau. Sur notre gamme de t_d , le coefficient de diffusion des métabolites (ADC) ne dépend pas du temps de diffusion dans les neurones et les astrocytes, ce qui est synonyme de l'absence de restriction. La modélisation de nos données avec des modèles analytiques simples mimant la structure cellulaire suggère que les métabolites ne sont pas confinés dans les corps cellulaires (seules des sphères avec des diamètres trop larges pour être réalistes peuvent expliquer la stabilité de l'ADC) ou des petits compartiments intracellulaires (noyau, mitochondrie...) mais plutôt qu'ils diffusent dans des longues et fines fibres (prolongements astrocytaires, dendrites et axones). Ces résultats sont par exemple cohérents avec l'idée qu'une reconfiguration des structures fibrillaires en « perles », et non pas un gonflement des corps cellulaires, est responsable d'une baisse du coefficient de diffusion de l'eau après un accident ischémique (Budde and Frank, 2010). Enfin, si aux temps longs l'ADC des métabolites est caractéristique de la diffusion non restreinte le long des fibres, alors l'ADC mesuré est sensible à des variations de viscosité et de tortuosité intracellulaire : une modification d'un de ces paramètres change le niveau du plateau $D_{intra}/3$. Cette technique pourrait permettre de détecter des altérations intracellulaires dans les maladies d'Alzheimer et de Huntington, où l'accumulation de tau hyperphosphorylé et de huntingtine mutée (Meraz-Rios et al., 2013 ; Arrasate and Finkbeiner, 2012) sont susceptibles de modifier D_{intra} .

Suite à ce travail, plusieurs perspectives sont envisageables : mesurer le coefficient de diffusion des métabolites dans des voxels contenant majoritairement soit de la substance grise soit de la substance blanche afin de caractériser la dépendance de l'ADC au temps de diffusion dans ces deux tissus (chapitre 4), mesurer l'ADC sur une gamme de temps de diffusion plus large pour améliorer la modélisation des données expérimentales et potentiellement mettre en évidence une différence subtile entre métabolites « neuronaux » et métabolites « astrocytaires » (chapitre 5).

L'essentiel du travail décrit ici a fait l'objet d'une présentation orale au congrès de l'ISMRM (International Society of Magnetic Resonance in Medicine) à Melbourne, Australie en Mai 2012 (présentation n°301) et d'un article publié dans le journal NeuroImage (Najac et al., 2014).

ETUDE DE LA DIFFUSION DES METABOLITES DANS LA SUBSTANCE GRISE ET LA SUBSTANCE BLANCHE

Dans notre étude précédente dans le cerveau du macaque, les données expérimentales ont été acquises dans un large voxel (~ 5.8 mL) pour augmenter le rapport signal-sur-bruit (SNR). Ce voxel, positionné dans le lobe fronto-pariétal, contient un mélange équivalent de substance grise (SG) et de substance blanche (SB). Dans le but d'étudier la compartimentation des métabolites dans ces deux tissus séparément, nous avons souhaité répéter notre étude à temps de diffusion long dans deux voxels : un voxel contenant majoritairement de la SG et un autre voxel contenant majoritaire de la SB. Les contraintes de SNR ne permettent pas d'effectuer ces mesures dans le cerveau du macaque où les voxels seraient très petits. Nous avons donc exploré la diffusion des métabolites neuronaux et astrocytaires dans le cerveau de l'Homme *in vivo*. Toutes les mesures ont été effectuées au Leiden University Medical Center (LUMC) aux Pays-Bas en collaboration avec Francesca Branzoli et Itamar Ronen.

4.1. Spectroscopie du tenseur de diffusion

Dans notre étude chez le macaque, la taille et le positionnement du voxel étaient tels que la distribution d'orientation des fibres à l'intérieur du voxel pouvait être considérée comme isotropique, c.-à-d. la diffusion était la même dans les trois directions. C'est pourquoi, nous avons choisi d'appliquer les gradients de diffusion simultanément sur les trois axes (x , y et z). Dans notre nouvelle étude chez l'Homme, afin de s'affranchir de l'anisotropie des tissus (en particulier dans la SB), nous avons choisi de mesurer la trace du tenseur de diffusion.

La diffusion anisotrope est définie par un tenseur de diffusion D symétrique :

$$D = \begin{pmatrix} D_{xx} & D_{xy} & D_{xz} \\ D_{xy} & D_{yy} & D_{yz} \\ D_{xz} & D_{yz} & D_{zz} \end{pmatrix} \quad (4.1)$$

où les termes diagonaux correspondent aux coefficients de diffusion dans les directions x, y et z tandis que les termes non diagonaux représentent la covariance entre les directions $x/y, y/z$ et x/z .

Afin de définir l'ensemble du tenseur de diffusion, six acquisitions avec six orientations différentes pour les gradients de diffusion G_x, G_y et G_z sont généralement nécessaires. Les expressions du facteur de pondération en diffusion et de l'atténuation du signal RMN sont alors de la forme :

$$b = \begin{pmatrix} b_{xx} & b_{xy} & b_{xz} \\ b_{xy} & b_{yy} & b_{yz} \\ b_{xz} & b_{yz} & b_{zz} \end{pmatrix} = \gamma^2 \delta^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3} \right) * \begin{pmatrix} G_x^2 & G_x G_y & G_x G_z \\ G_x G_y & G_y^2 & G_y G_z \\ G_x G_z & G_y G_z & G_z^2 \end{pmatrix} \quad (4.2)$$

$$\ln \left(\frac{S}{S_0} \right) = -b_{xx} D_{xx} + b_{yy} D_{yy} + b_{zz} D_{zz} + 2b_{xy} D_{xy} + 2b_{xz} D_{xz} + 2b_{yz} D_{yz} \quad (4.3)$$

A l'opposé, la trace du tenseur de diffusion est indépendante du référentiel et nécessite, pour être déterminée, seulement trois acquisitions avec des directions orthogonales (par exemple : $[1 \ 0 \ 0], [0 \ 1 \ 0], [0 \ 0 \ 1]$).

On peut alors définir une valeur ADC_{trace} insensible à l'anisotropie du tissu:

$$ADC_{trace} = \frac{Trace(D)}{3} = \frac{D_{xx} + D_{yy} + D_{zz}}{3} \quad (4.4)$$

4.2. Mesure de l' ADC_{trace} *in vivo*

Les acquisitions ont été effectuées sur l'IRM 7 T Philips Achieva (Philips Healthcare, Best, Pays-Bas) du LUMC, équipé de gradients pouvant atteindre une amplitude de 40 mT/m en 200 μ s sur chaque axe. Une antenne 1H birdcage en quadrature pour l'émission et une antenne 1H 32 canaux en réseau phasé pour la réception radiofréquence (Nova Medical Ins., Wilmington, MA) ont été utilisées.

4.2.1. Protocole expérimental

Seize volontaires sains et jeunes (âge 25 ± 5 ans, 9 femmes et 7 hommes) ont participé à cette étude.

Images Anatomiques

Au cours de chaque session d'imagerie, une première image rapide de référence est acquise avec la séquence SENSE (SENSitivity ENcoding) suivie d'une image 3D pondérée T_1 avec une séquence d'écho de gradient (champ de vue : 246.4x246.4x174.0 mm³ (AP, FH, RL), résolution spatiale : 1x1x1 mm³, TR/TE=4.7/2.1 ms). La durée totale d'acquisition est de 3 minutes.

Spectroscopie du tenseur de diffusion

Les spectres ont été acquis dans deux voxels : un premier voxel (20x20x30 mm³) positionné dans le lobe occipital et un deuxième voxel (20x20x30 mm³) positionné dans le lobe pariétal (figure 4.1.1) avec une séquence STEAM (TE=50 ms). Un oxymètre a été utilisé pour synchroniser les acquisitions avec la fréquence cardiaque (TR=3 s) afin de limiter les fluctuations de l'amplitude du signal liées aux pulsations cardiaques. Le shim a été ajusté avec une méthode développée par Philips (technique « pencil beam » qui utilise les gradients de shim de deuxième ordre). Une suppression totale du signal de l'eau a été utilisée pour les spectres acquis sans pondération en diffusion ($b=0$ s/mm²) tandis qu'une suppression partielle du signal de l'eau a été utilisée pour les spectres pondérés en diffusion afin d'utiliser le pic de la résonance de l'eau pour la correction individuelle en phase et en fréquence lors du traitement des données. Les gradients de diffusion ($\delta=24$ ms) ont été appliqués successivement selon trois directions orthogonales afin de s'affranchir de l'anisotropie lors du calcul de la trace du tenseur de diffusion. La direction des gradients ([1 1 -0.5], [-0.5 1 1], [1 -0.5 1]) a été choisie de manière à maximiser l'amplitude du gradient effectif $G_{eff} = G * \sqrt{1^2 + 1^2 + 0.5^2} = 1.5 * G$ et donc à augmenter la pondération en diffusion d'un facteur 2.25 (Gudbjartsson et al., 1996). Les spectres ont été acquis avec trois temps de diffusion ($t_d=92, 542$ et 712 ms) obtenus en variant le temps de mélange TM et deux valeurs de b ($b=0$ et 3030 s/mm² à $t_d=92$ ms, $b=0$ et 3166 s/mm² à $t_d=542$ ms et $b=0$ et 3118 s/mm² à $t_d=712$ ms). Un schéma de gradient de diffusion bipolaire a été utilisé pour minimiser l'artéfact dû aux courants de Foucault. Pour minimiser le biais introduit par les termes croisés entre les gradients de diffusion et les autres gradients (gradients d'imagerie de la séquence et gradients dus aux inhomogénéités du champ magnétique) sur la mesure de l'ADC aux temps de diffusion longs, les spectres de diffusion ont été acquis avec la polarité opposée pour chaque direction des gradients de diffusion et chaque t_d . Afin de conserver un SNR similaire, les spectres ont été acquis avec un nombre croissant de répétitions pour chaque t_d (32 répétitions pour $t_d=92/542$ ms et 48 répétitions pour $t_d=712$ ms). Des spectres sans suppression de l'eau (4 répétitions) ont également été acquis pour corriger l'artéfact lié à la présence des courants de Foucault sur les spectres des métabolites (Klose, 1990) lors du traitement des données.

Pour chaque session, les spectres des métabolites et de l'eau à deux temps de diffusion et dans un seul voxel ont été enregistrés (temps d'acquisition ~ 50 min) résultant en $N=4$ à $t_d=92/712$ ms et $N=3$ à $t_d=542$ ms dans le lobe pariétal et $N=5$ à $t_d=92/542$ ms et $N=6$ à $t_d=712$ ms dans le lobe occipital.

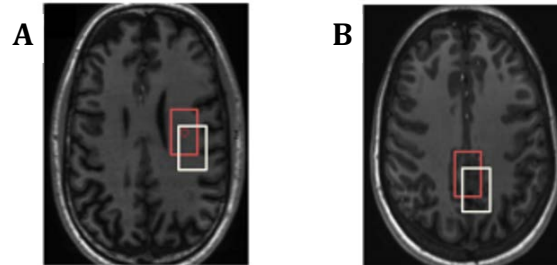


Figure 4.1.1 : Position du voxel ($20 \times 20 \times 30$ mm³) pour le NAA (rouge) et l'eau (blanc) dans le lobe pariétal (A) et le lobe occipital (B).

4.2.2. Traitement des données

Images Anatomiques

Les images pondérées T_1 ont été segmentées en utilisant FSL (Brain Extraction Tool (Smith, 2002), FMRIB's Automated Segmentation Tool (Zhang et al., 2001) et Matlab (The Mathworks, Natick, MA, USA) pour déterminer la fraction volumique de SB, de SG et de liquide céphalorachidien (LCR).

Spectroscopie du tenseur de diffusion

Le traitement des données a été réalisé avec Matlab (The Mathworks, Natick, MA, USA). Pour chaque valeur de t_d , b et polarité des gradients, les spectres individuels ont été corrigés en phase et en fréquence avant d'être sommés, et les courants de Foucault ont été corrigés en utilisant le spectre de référence de l'eau correspondant. L'analyse des spectres a ensuite été effectuée avec LCModel (Provencher, 1993) en utilisant une base, générée sous Matlab, différente pour chaque t_d . Les métabolites inclus dans la modélisation sont : le NAA total ($tNAA=NAA+NAAG$), la créatine totale ($tCr=Cr+PCr$), les composés choline ($tCho=Cho+PCho+GPC$), le glutamate (Glu), le myo-inositol (Ins), la glutamine (Gln), le GABA, le lactate (Lac), l'alanine (Ala), la taurine (Tau), le glutathion (GSH) et le glucose (Glc). Seuls les métabolites avec un Cramér-Rao Lower Bound (CRLB, erreur sur la valeur absolue de la concentration indiquée par LCModel) inférieur à 10% sont retenus pour l'analyse : $tNAA$, tCr et $tCho$. Pour chaque direction, l'ADC des métabolites est calculé à partir du logarithme de la moyenne géométrique du signal mesuré avec les deux polarités divisée par le signal de référence (signal mesuré sans pondération en diffusion) pour

supprimer le biais introduit par les termes croisés (Neeman et al., 1991 ; Jara and Wehrli, 1994).

La trace de l'ADC est estimée en moyennant l'ADC calculé pour chaque direction :

$$ADC_{trace} = \frac{1}{3b} \left(\ln \left(\frac{\sqrt{(S_+ * S_-)_{[1 \ 1 \ -0.5]}}}{(S_0)_{[1 \ 1 \ -0.5]}} \right) + \ln \left(\frac{\sqrt{(S_+ * S_-)_{[-0.5 \ 1 \ 1]}}}{(S_0)_{[-0.5 \ 1 \ 1]}} \right) + \ln \left(\frac{\sqrt{(S_+ * S_-)_{[1 \ -0.5 \ 1]}}}{(S_0)_{[1 \ -0.5 \ 1]}} \right) \right) \quad (4.6)$$

Enfin, la trace du coefficient de diffusion de l'eau a également été calculée en utilisant les spectres sans suppression de l'eau. Le signal de l'eau sur les spectres avec et sans pondération en diffusion a été mesuré à partir de l'aire sous le pic de la résonance de l'eau.

4.2.3. Résultats

Validation de la correction des termes croisés

Une expérience supplémentaire sur un fantôme d'eau nous a permis de vérifier que la contamination liée aux termes croisés entre les gradients de diffusion et les gradients d'imagerie était correctement supprimée en inversant la polarité des gradients de diffusion et calculant la moyenne géométrique du signal acquis avec les deux polarités. Pour cette expérience, les spectres ont été acquis avec deux valeurs de b (0 et 770 s/mm²) et deux temps de diffusion ($t_d=92$ et 542 ms). Les valeurs de la trace de l'ADC de l'eau sont rapportées dans la table 4.2.1. On peut observer une différence importante entre la valeur de ADC_{trace} mesurée avec les deux polarités: plus le t_d augmente, plus ADC_{trace} augmente avec les gradients positifs et diminue avec les gradients négatifs. Lorsque la moyenne géométrique du signal mesuré avec les deux polarités est calculée, ADC_{trace} ne dépend pas de t_d . Cela démontre l'importance du biais lié aux termes croisés pour des grandes valeurs de t_d . Rappelons tout de même que cette méthode ne permet pas de corriger le biais introduit par des gradients qui varient spatialement à l'échelle microscopique (chapitre 6).

	$t_d=92$ ms	$t_d=542$ ms
Gradients de diffusion positifs	2.6	3.7
Gradients de diffusion négatifs	1.2	0.1
Moyenne géométrique	1.9	1.9

Table 4.2.1 : Quantification de l'effet des termes croisés *in vitro* avec un fantôme d'eau. La trace du coefficient de diffusion de l'eau ($\mu\text{m}^2/\text{ms}$) ne dépend pas de t_d lorsque la moyenne géométrique du signal acquis avec les deux polarités est calculée.

Fraction volumique de SG, SB et LCR

La table 4.2.2 montre que la fraction volumique de SG et SB est significativement différente dans les deux voxels positionnés dans le lobe pariétal et le lobe occipital. Le premier voxel contient majoritairement de la SB tandis que le deuxième voxel contient majoritairement de la SG.

	Voxel pariétal	Voxel occipital
SB (%)	86.0±4.4	23.9±4.8
SG (%)	12.7±3.9	65.1±7.1
LCR (%)	1.3±0.8	11.0±4.9

Table 4.2.2 : Proportions de SG, SB et LCR dans les deux voxels positionnés dans le lobe pariétal et le lobe occipital.

Trace du coefficient de diffusion des métabolites *in vivo*

La figure 4.2.1 illustre la qualité des spectres obtenus au temps de diffusion le plus long dans les deux voxels d'intérêt. Le SNR (SNR=16±3 sans pondération en diffusion et SNR=11±2 avec pondération en diffusion mesuré pour le tNAA) nous a permis de mesurer avec LCModel le signal du tNAA, tCr et tCho (CRLB<10%).

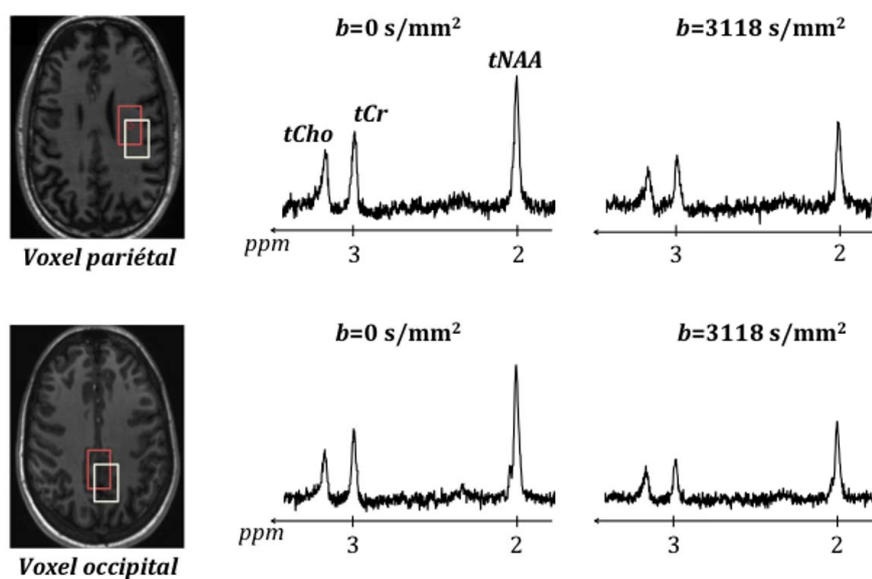


Figure 4.2.1 : Exemples de spectres acquis à $t_d=712 \text{ ms}$ dans le voxel pariétal et le voxel occipital avec ($b=3118 \text{ s/mm}^2$) et sans ($b=0 \text{ s/mm}^2$) pondération en diffusion dans une direction. La position des voxels est montrée pour le NAA (rouge) et l'eau (blanc).

Dans les deux voxels d'intérêt, la trace du coefficient de diffusion des trois métabolites ne dépend pas du temps de diffusion (figure 4.2.2). Les valeurs de l' $\text{ADC}_{\text{trace}}$ sont rapportées dans la table 4.2.3. Pour tNAA et tCr, la moyenne de tous les $\text{ADC}_{\text{trace}}$ aux différents temps de diffusion

est significativement plus faible dans la SG que dans la SB (p-value<0.007, calculée à l'aide d'un test statistique de Student non apparié). Ces résultats sont cohérents avec les données de la littérature (Ellegood et al., 2011 ; Kan et al., 2012). Bien que l'ADC_{trace} de la tCho soit différent entre les deux tissus, la différence enregistrée dans notre étude n'est pas significative (p-value=0.064, calculée à l'aide d'un test statistique de Student non apparié).

tNAA	$t_d=92$ ms	$t_d=542$ ms	$t_d=712$ ms	Moyenne
Voxel pariétal (SB)	0.16±0.02	0.16±0.02	0.14±0.02	0.15±0.02
Voxel occipital (SG)	0.11±0.01	0.10±0.02	0.11±0.03	0.11±0.02
p-value				4e-6

tCr	$t_d=92$ ms	$t_d=542$ ms	$t_d=712$ ms	Moyenne
Voxel pariétal (SB)	0.16±0.02	0.14±0.02	0.12±0.02	0.14±0.02
Voxel occipital (SG)	0.12±0.01	0.10±0.02	0.12±0.02	0.11±0.02
p-value				0.007

tCho	$t_d=92$ ms	$t_d=542$ ms	$t_d=712$ ms	Moyenne
Voxel pariétal (SB)	0.12±0.01	0.12±0.02	0.09±0.01	0.11±0.02
Voxel occipital (SG)	0.10±0.01	0.09±0.02	0.09±0.02	0.10±0.02
p-value				0.064

Table 4.2.3 : ADC_{trace} des métabolites mesuré *in vivo* (moyenne±s.d. en $\mu\text{m}^2/\text{ms}$). Les spectres à deux temps de diffusion et dans un seul voxel ont été enregistrés au cours de chaque session résultant en N=4 à $t_d=92/712$ ms et N=3 à $t_d=542$ ms dans le lobe pariétal et N=5 à $t_d=92/542$ ms et N=6 à $t_d=712$ ms dans le lobe occipital. Un test statistique de Student non apparié (p-value) a été effectué pour comparer la valeur de l'ADC_{trace} (ensemble des valeurs mesurées aux trois temps de diffusion pour chaque métabolite) dans les deux tissus.

Trace du coefficient de diffusion de l'eau *in vivo*

Comme pour les métabolites, la trace du coefficient de l'eau ne dépend pas du temps de diffusion dans les deux voxels considérés (figure 4.2.2). Contrairement au tNAA et tCr, ADC_{trace} de l'eau est significativement plus bas dans la SB que dans la SG (table 4.2.4). Les valeurs mesurées pour l'eau sont plus faibles que les valeurs rapportées dans la littérature (Ellegood et al., 2005). Cette différence peut être attribuée à la plus faible valeur de b utilisée dans l'étude de Ellegood et al. ($b_{\text{max}}=1305$ s/mm²) et au caractère non mono-exponentiel de l'atténuation du signal de l'eau. Une étude récente conduite à 7 T avec une valeur de b proche de celle choisie dans notre étude

($b_{max}=4575 \text{ s/mm}^2$) et dans un voxel positionné dans le lobe pariétal (SB) montre des valeurs pour ADC_{trace} proche de nos valeurs (Branzoli et al., 2014).

Eau	$t_d=92 \text{ ms}$	$t_d=542 \text{ ms}$	$t_d=712 \text{ ms}$	Moyenne
Voxel pariétal (SB)	0.43 ± 0.02	0.40 ± 0.03	0.41 ± 0.03	0.42 ± 0.03
Voxel occipital (SG)	0.65 ± 0.05	0.59 ± 0.03	0.56 ± 0.05	0.60 ± 0.06
p-value	8e-11			

Table 4.2.4 : ADC_{trace} de l'eau mesuré in vivo (moyenne \pm s.d., $\mu\text{m}^2/\text{ms}$). Un test statistique de Student non apparié (p-value) a également été effectué pour comparer la valeur de l' ADC_{trace} (ensemble des valeurs mesurées aux trois temps de diffusion) dans les deux tissus.

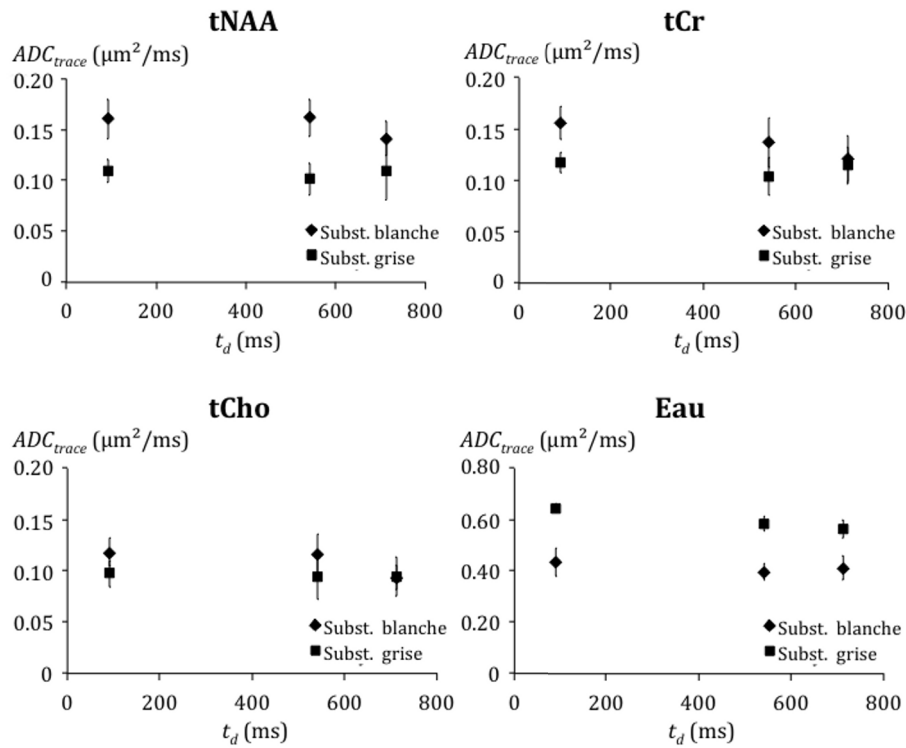


Figure 4.2.2 : ADC_{trace} du tNAA, tCr, tCho et de l'eau à trois temps de diffusion ($t_d=92, 542$ et 712 ms) dans un voxel contenant majoritairement de la SB et un voxel contenant majoritairement de la SG. Les valeurs et les barres d'erreur représentées correspondent à la moyenne et la déviation standard sur l'ensemble des acquisitions ($N=4$ à $t_d=92/712 \text{ ms}$ et $N=3$ à $t_d=542 \text{ ms}$ dans la SB et $N=5$ à $t_d=92/542 \text{ ms}$ et $N=6$ à $t_d=712 \text{ ms}$ dans la SG).

4.3. Discussion

La bonne qualité des spectres et la correction efficace des termes croisés nous ont permis de mesurer avec précision la trace du coefficient de diffusion (ADC_{trace}) de trois métabolites (tNAA,

tCr et tCho) et de l'eau dans deux voxels très différents : un voxel pariétal contenant $86.0 \pm 4.4\%$ de substance blanche et un voxel occipital contenant $65.1 \pm 7.1\%$ de substance grise.

Comparaison avec les données de la littérature

Les valeurs d'ADC_{trace} des trois métabolites dans les deux voxels sont légèrement plus basses que les valeurs trouvées dans la littérature (Posse et al., 1993 ; Harada et al., 2002 ; Kroenke et al., 2004 ; Ellegood et al., 2005 ; Ellegood et al., 2006 ; Upadhyay et al., 2007 ; Upadhyay et al., 2008 ; Ellegood et al., 2011 ; Kan et al., 2012 ; Wood et al., 2012 ; Branzoli et al., 2013 ; Ronen et al., 2013). Cette différence peut être expliquée par :

- la composition en SG, SB et LCR des voxels d'intérêt positionnés dans le corps calleux (Kroenke et al., 2004 ; Ellegood et al., 2005 ; Upadhyay et al., 2007 ; Wood et al., 2012 ; Ronen et al., 2013), dans le cortex visuel primaire (Branzoli et al., 2013), dans le lobe frontal (Ellegood et al., 2005) et dans le faisceau arqué (Upadhyay et al., 2008),
- des délais entre les gradients de diffusion plus courts ($\Delta=57.5$ ms) raccourcissant ainsi le temps de diffusion (Kan et al., 2012),
- une plus faible sensibilité pour les études réalisées à 1.5 T (Posse et al., 1993 ; Harada et al., 2002 ; Kroenke et al., 2004) ou 3 T (Ellegood et al., 2005; Ellegood et al., 2006; Upadhyay et al., 2007; Upadhyay et al., 2008; Ellegood et al., 2011),
- l'absence de correction des termes croisés entraînant une surestimation de l'ADC_{trace} bien que dans une étude précédente, Kan et al. ont montré que le biais induit par les termes croisés n'était pas significatif dans le cas d'une séquence PRESS (Kan et al., 2012) .

Stabilité de ADC_{trace} dans la SG et la SB

L'ADC_{trace} du tNAA, tCr et tCho ne dépend pas du temps de diffusion dans nos deux voxels d'intérêt. Ces résultats sont similaires à ceux trouvés chez le macaque (chapitre 3) à 7 T dans un voxel contenant un mélange de SG et SB. Cela suggère donc qu'aux temps de diffusion longs, ADC_{trace} reflète une composante de diffusion « libre ». Le petit échantillon de temps de diffusion étudié ici ne nous a pas permis d'utiliser les modèles analytiques. Néanmoins, il est possible d'utiliser nos observations chez le macaque et nos modèles analytiques pour expliquer la stabilité de l'ADC_{trace}.

Les métabolites peuvent diffuser dans des fibres (prolongements astrocytaires, axones, dendrites) modélisables par des cylindres avec un diamètre $d \sim 5$ μm , dans des corps cellulaires que l'on peut représenter par des sphères de diamètre $d \sim 20$ μm ou dans des organelles (noyau, mitochondries...) qui peuvent être modélisées par des sphères de diamètre $d \sim 5$ μm . Dans les deux derniers cas, sur notre gamme de t_d (entre 92 et 712 ms), l'ADC_{trace} ~ 0 . A l'opposé, si les

métabolites diffusent dans des fibres $ADC_{\text{trace}} \sim D_{\text{intra}}/3$ où D_{intra} est le coefficient de diffusion « libre » intracellulaire (qui dépend de la tortuosité intracellulaire). Nous avons utilisé nos modèles analytiques pour simuler ces trois possibilités (figure 4.3.1). Pour la valeur de D_{intra} , nous avons utilisé la moyenne de deux valeurs du coefficient de diffusion libre du tNAA dans la substance blanche rapportées dans la littérature chez l'Homme (Kroenke et al., 2004 ; Ronen et al., 2013), soit $D_{\text{intra}} = 0.37 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ (dans la SB). Comme illustré sur la figure 4.3.1 pour le tNAA dans la SG, la stabilité de l' ADC_{trace} suggère donc que les métabolites diffusent dans la direction parallèle à l'axe des prolongements astrocytaires, des dendrites et des axones plutôt que dans les corps cellulaires et les organelles où la diffusion est fortement restreinte dans les trois directions de l'espace. Cette information très spécifique sur la localisation des métabolites dans les compartiments cellulaires est difficilement obtenue avec les techniques classiques de microscopie. Cela démontre donc la puissance de la spectroscopie pondérée en diffusion. Par exemple, il est connu que le NAA est majoritairement synthétisé dans les mitochondries des neurones (Patel and Clark, 1979). Il pourrait donc être tentant de penser qu'une majorité de la population de NAA est localisée à l'intérieur des mitochondries. Au contraire, nos résultats suggèrent qu'après avoir été synthétisé, le NAA sort de la mitochondrie et diffuse dans le cytoplasme.

Les molécules d'eau sont présentes dans le milieu intra- et extracellulaire et peuvent diffuser au travers des membranes plasmiques. La stabilité de l' ADC_{trace} de l'eau est donc cohérente avec l'idée que la diffusion des molécules d'eau est moins restreinte que celle des métabolites.

Microstructure de la SG et la SB

La compartimentation des métabolites (tNAA dans les neurones, tCho dans les astrocytes et tCr dans les deux types cellulaires) permet d'avoir accès à des informations spécifiques sur la microstructure des neurones et des astrocytes dans la substance grise et la substance blanche (Urenjak et al., 1993 ; Choi et al., 2007).

Les astrocytes de la substance blanche, « astrocytes fibreux », ont une forme allongée et de longs prolongements très peu ramifiés tandis que les astrocytes de la substance grise, « astrocytes protoplasmiques » ont de nombreux prolongements courts distribués de manière homogène autour du corps cellulaire (Nedergaard et al., 2003 ; Oberheim et al., 2012) (figure 2.1.1 du chapitre 2). De plus, les « astrocytes fibreux » sont orientés longitudinalement au plan des faisceaux de fibres (Oberheim et al., 2009 ; Budde et al., 2011 ; Lundgaard et al., 2013). Les corps cellulaires des neurones et les dendrites sont majoritairement localisés dans la substance grise alors que les axones myélinisés sont dans la substance blanche (Zhang and Sejnowski, 2000 ; Assaf and Pasternak, 2008 ; Filley, 2010). La stabilité de l' ADC_{trace} dans la substance blanche

confirme donc l'hypothèse selon laquelle les métabolites diffusent dans des structures fibrillaires (astrocytes allongés et axones myélinisés dans la SB). La stabilité de l' ADC_{trace} à une valeur non nulle dans la substance grise suggère également que les métabolites neuronaux et astrocytaires diffusent dans des fibres. Cette observation est cohérente avec les mesures de la fraction volumique des fibres (neuronaux et astrocytaires) trouvées dans la littérature. Dans différentes régions de la substance blanche et régions corticales et sous-corticales du cerveau du babouin, une étude a montré que 65% du volume intracellulaire est occupé par des fibres (Jespersen et al., 2007). Dans une autre étude, Chklovskii et al. ont estimé que la fraction volumique cellulaire des fibres dans la substance grise de la souris est de $\sim 85\%$ (soit $\sim 65\%$ du volume intracellulaire) (Chklovskii et al., 2002). Il semble donc cohérent que nos résultats reflètent la diffusion des métabolites dans des fibres, compartiments majoritaires au niveau intracellulaire. Les 35% restants sont quasi-indétectables aux temps de diffusion utilisés.

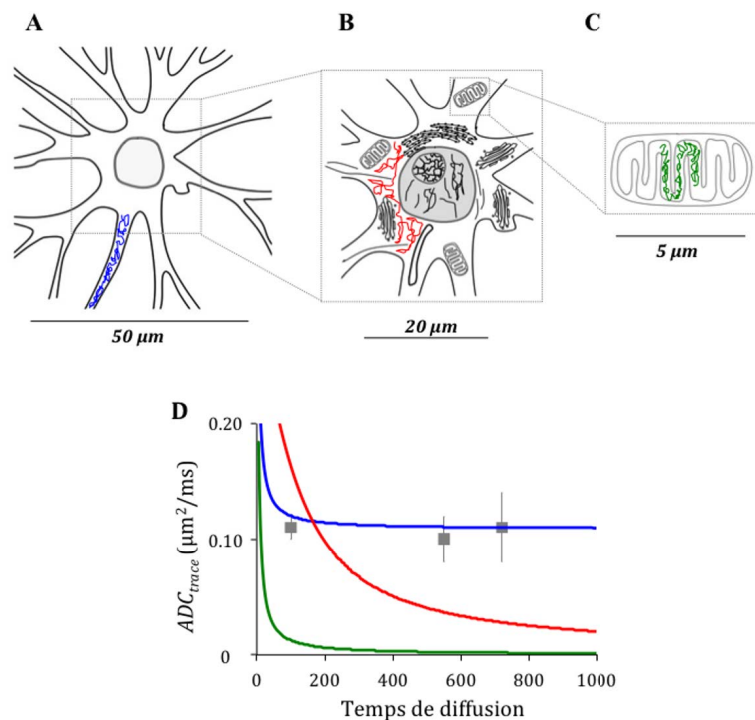


Figure 4.3.1 : Effet de la compartimentation des métabolites sur la dépendance de l' ADC_{trace} au temps de diffusion. (A-C) Exemples de déplacements d'un métabolite dans une fibre (bleu), dans un corps cellulaire (rouge) et dans une mitochondrie (vert). L'encombrement intracellulaire ne permet pas au métabolite de sortir du corps cellulaire. (D) Utilisation des modèles analytiques décrits précédemment (chapitres 2 et 3) pour simuler ces trois situations : diffusion dans des cylindres de diamètre $d \sim 5 \mu m$ (bleu), dans une sphère de diamètre $d \sim 20 \mu m$ (rouge) et dans une sphère de diamètre $d \sim 5 \mu m$ (vert). Pour D_{intra} , nous avons utilisé la moyenne de deux valeurs du coefficient de diffusion libre du tNAA chez l'Homme rapportées dans la littérature (Kroenke et al., 2004, Ronen et al., 2013), soit $D_{intra} = 0.37 \mu m^2/ms$ (dans la SB).

Différence entre SG et SB

La différence entre l' ADC_{trace} dans la SG et dans la SB du tNAA et tCr est en accord avec la littérature (Ellegood et al., 2011 ; Kan et al., 2012). Dans les deux tissus, les métabolites diffusent dans des fibres, c.-à-d. $ADC_{\text{trace}} \sim D_{\text{intra}}/3$. On peut alors supposer que la différence de diffusion entre les deux tissus est induite par une différence de D_{intra} , c.-à-d. que la viscosité, l'encombrement intracellulaire et la tortuosité seraient plus importants dans la SG. Cette hypothèse serait par exemple en accord avec l'idée que la densité de mitochondrie dans la SG est plus importante pour répondre à une demande plus forte du métabolisme oxydatif, conduisant à une augmentation de la tortuosité et par conséquent une diminution de D_{intra} dans la SG (Valette et al., 2008).

4.4. Conclusion

La stabilité de l' ADC_{trace} suggère que les métabolites neuronaux et astrocytaires diffusent majoritairement dans des structures fibrillaires dans la substance grise et dans la substance blanche. Cela montre que la mesure par spectroscopie de diffusion aux temps de diffusion longs est potentiellement sensible à des altérations du coefficient de diffusion intracellulaire D_{intra} (qui dépend lui-même de la viscosité du cytosol, de l'encombrement et de la tortuosité intracellulaire). Ce résultat est cohérent avec les simulations réalisées au chapitre 2 (figure 2.1.4-B). Dans le contexte des maladies neurodégénératives, une augmentation de l'un de ces paramètres pourrait être liée à une accumulation de tau hyperphosphorylé dans la maladie d'Alzheimer et de huntingtine mutée dans la maladie d'Huntington (Meraz-Rios et al., 2013 ; Arrasate and Finkbeiner, 2012), et pourrait donc potentiellement être détectée sur la gamme de t_d accessible sur des scanners cliniques. A l'opposé, sur cette gamme de t_d , la mesure est peu sensible à des modifications de la taille des cellules (atrophie ou hypertrophie neuronale et astrocytaire). Pour détecter des altérations du diamètre des fibres il serait nécessaire d'aller à des temps de diffusion beaucoup plus courts (Marchadour et al., 2012) tandis que pour détecter des altérations de la longueur des fibres il serait nécessaire d'aller à des temps beaucoup plus longs (chapitre 5).

L'essentiel du travail décrit ici a été présenté sous la forme d'un poster électronique au congrès de l'ISMRM à Salt Lake City, Etats-Unis en Mai 2013 (poster n°3999), un article a également été soumis en Juin 2014 à la revue Brain Structure and Function et est en cours de révision.

ETUDE DE LA DIFFERENCE ENTRE LES METABOLITES NEURONAUX ET ASTROCYTAIRES

Une différence importante entre la géométrie des neurones et des astrocytes réside dans la différence de longueur de leur structure fibrillaire (Fiala and Harris, 1999 ; Oberheim et al., 2009). Ainsi, les prolongements astrocytaires seraient sensiblement plus courts ($\sim 100 \mu\text{m}$) que les prolongements dendritiques ($>100 \mu\text{m}$). Pour des temps de diffusion de l'ordre de la seconde, le déplacement moyen des métabolites est de $\sim 15 \mu\text{m}$ ($l = \sqrt{2 * ADC * t_d}$, avec l la distance caractéristique parcourue pendant t_d et $ADC \sim 0.1 \mu\text{m}^2/\text{ms}$), ce qui est inférieur à la longueur des prolongements cellulaires. D'après les simulations effectuées à partir des modèles analytiques de la structure cellulaire (chapitre 2), il est nécessaire d'utiliser des temps de diffusion supérieurs à 10 s pour estimer la longueur des fibres (contribution $>50\%$, figure 2.1.4-B). Ces temps de diffusion ne sont pas accessibles avec une séquence STEAM où la perte de signal due à la relaxation T_1 sera trop importante à $T_M=10$ s (par exemple pour le tNAA, $T_1 \sim 1.83$ s dans la substance grise chez l'Homme à 7 T (Xin et al., 2013), on aurait donc une perte de signal de 99%). Cependant, nous pouvons supposer que le comportement de l'ADC des métabolites neuronaux (tNAA et Glu) et astrocytaires (tCho et Ins) aux temps longs est différent pour des temps de diffusion inférieurs à 10 s. Dans cette nouvelle étude, menée chez le macaque, nous avons étudié cette hypothèse. Pour cela, nous avons mesuré l'ADC des métabolites jusqu'à 2 s.

5.1. Mesure de l'ADC *in vivo* jusqu'à $t_d=2$ secondes

Les expériences ont été réalisées sur l'IRM 7 T Agilent (Palo Alto, CA, USA) de MIRCen. Nous avons utilisé une antenne ^1H de surface en quadrature pour l'émission et la réception radiofréquence (Rapid Biomedical).

5.1.1. Protocole expérimental

Les expériences ont été réalisées sur quatre macaques sains à jeun (*macaca fascicularis*, poids 4-6 kg). Le protocole d'anesthésie, de positionnement et du suivi des animaux est identique à celui

présenté au chapitre 3. Les constantes physiologiques sont restées stables: pressions systolique/diastolique $73 \pm 12 / 24 \pm 6$ mmHg, fréquence respiratoire 28 ± 6 min⁻¹, pression CO₂ expiré 32 ± 7 mmHg, température corporelle 36 ± 2 °C. Les spectres ont été acquis dans un large voxel ($18 \times 18 \times 18$ mm³) positionné dans le lobe fronto-pariétal (figure 3.2.1) contenant une quantité similaire de substance blanche et de substance grise. Les spectres localisés des métabolites (TR/TE=3550/18 ms) ont été acquis à un seul temps de diffusion ($t_d=2011$ ms obtenu en utilisant un temps de mélange TM de 2000 ms), pour deux valeurs de b (0 et 3000 s/mm²) et deux polarités pour les gradients de diffusion ($G=0, 17$ et -17 mT/m) avec la séquence STEAM introduite au chapitre 3. Pour chaque spectre, 384 scans ont été acquis, soit une durée d'acquisition totale d'environ 1 heure. Etant donné le nombre de répétitions nécessaires pour obtenir un rapport signal-à-bruit suffisant à TM=2000 s, il semble difficile d'atteindre à l'avenir des t_d significativement plus élevés en utilisant la séquence STEAM. Pour chaque valeur de b et polarité de gradients, des spectres de l'eau (séquence identique sans module VAPOR) ont été acquis pour corriger l'artéfact lié à la présence des courants de Foucault sur les spectres des métabolites (Klose, 1990).

5.1.2. Traitement des données

Le traitement des données a été réalisé avec Matlab (The Mathworks, Natick, MA, USA). Pour chaque valeur de b et polarité des gradients, les spectres individuels ont été corrigés en phase et en fréquence avant d'être sommés et les courants de Foucault ont été corrigés en utilisant le spectre de référence de l'eau. L'analyse des spectres a ensuite été effectuée avec LCModel (base générée sur Matlab et incluant les même métabolites que dans notre étude précédente chez le macaque, chapitre 3) (Provencher, 1993). L'ADC des métabolites a été calculé à partir de l'expression 3.5.

5.1.3. Résultats et discussion

La figure 5.1.1 illustre la qualité des spectres obtenus. Le SNR nous a permis de quantifier le signal de cinq métabolites: tNAA, tCr, tCho, Glu et Ins. Les ADC des cinq métabolites sont rapportés dans la table 5.1.1. Les conditions expérimentales utilisées pour mesurer l'ADC des métabolites lors de notre première étude ($t_d=86$ à 1011 ms) et la nouvelle ($t_d=2011$ ms) étant identiques, nous avons regroupé l'ensemble des données pour étudier la diffusion des métabolites sur une gamme de temps plus large. La réalisation d'un test statistique de Student ne montre aucune différence significative entre $t_d=1011$ et 2011 ms pour l'ensemble des métabolites à l'exception du glutamate qui atteint juste le seuil de significativité.

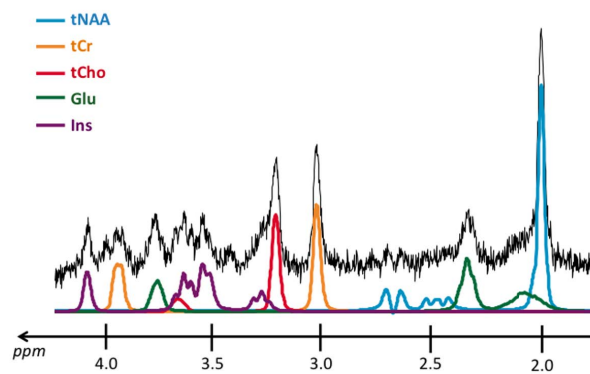


Figure 5.1.1 : Spectre acquis à $t_d=2011$ ms, $b=3000$ s/mm² ($G>0$) et décomposition LCMModel.

	tNAA	tCr	tCho	Glu	Ins
ADC ($\mu\text{m}^2/\text{ms}$)	0.105 ± 0.012	0.104 ± 0.021	0.080 ± 0.019	0.101 ± 0.011	0.077 ± 0.011
$t_d=2011\text{ms}$					
p-value	0.533	0.549	0.774	0.050	0.441
$t_d=1011$ et 2011ms					

Table 5.1.1 : ADC des métabolites mesurés pour $t_d=2011$ ms (moyenne \pm s.d., $N=4$) et p-value calculée à l'aide d'un test statistique *t* de Student non apparié en comparant l'ensemble des valeurs d'ADC mesurées aux deux temps de diffusion.

La figure 5.1.2 illustre la variation de l'ADC en fonction de t_d . On observe que l'ADC reste relativement stable sur l'ensemble de la fenêtre [86 ; 2011] ms, ce qui confirme que les métabolites diffusent dans les structures fibrillaires. Dans le but d'étudier des différences de diffusion entre les métabolites, nous avons ensuite utilisé un modèle analytique mimant la structure cellulaire.

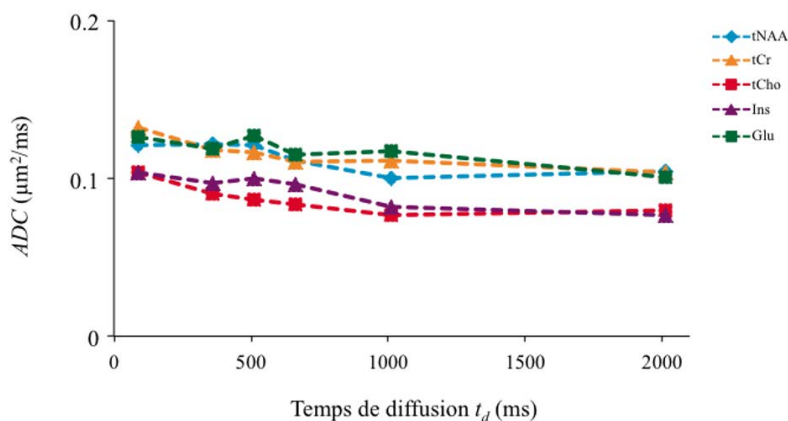


Figure 5.1.2 : Variation de l'ADC des cinq métabolites en fonction de t_d (moyenne sur l'ensemble des acquisitions, c.-à-d. $N=5$ à $t_d=86, 361$ et 1011 ms et $N=4$ à $t_d=511, 661$ et 2011 ms).

5.2. Modélisation des données expérimentales

5.2.1. Description du modèle

Nos études précédentes chez le macaque et l'Homme nous ont permis de montrer que le modèle des « corps cellulaires » (c.-à-d. compartiment clos) ne permet pas de décrire la diffusion intracellulaire. Au contraire, nous avons observé que les métabolites neuronaux et astrocytaires diffusent majoritairement dans des structures fibrillaires dans la substance blanche et la substance grise (chapitres 3 et 4). Le modèle utilisé au chapitre 3 est une simplification du modèle présenté au chapitre 2 (ensemble de cylindres de longueur $2L$ et de diamètre d isotropiquement orientés dans les trois dimensions de l'espace). Nous avons en effet considéré au vu de notre gamme de t_d que les métabolites diffusent dans des fibres de longueur infinie afin de limiter le nombre de paramètres à ajuster. Ici, nous avons décidé d'utiliser le modèle présenté au chapitre 2 mais nous avons imposé le diamètre des fibres $d=3\text{ }\mu\text{m}$ (valeur en accord avec la littérature et nos données expérimentales) afin de limiter le nombre de paramètres libres.

5.2.2. Validation du modèle par simulations

Le modèle utilisé (modèle des « neurites ») représente l'architecture cellulaire de manière très simplifiée : les cylindres ne sont pas ramifiés et ne sont pas interconnectés au niveau du corps cellulaire (figure 5.2.1). Il est possible que cette simplification biaise notre modélisation et conduise donc à une sur- ou sous-estimation de la longueur des fibres L . Afin de tester l'importance d'un changement de fibre au niveau d'un nœud, nous avons développé un modèle numérique 3D permettant de simuler la diffusion de particules le long d'un segment de longueur L (figure 5.2.1). A une extrémité du segment la particule rebondit contre une paroi (extrémité d'une fibre) tandis qu'à l'autre extrémité la particule peut changer de segment (nœud) et diffuser le long d'un nouveau segment de longueur L ayant une orientation différente tirée aléatoirement (définie par deux angles θ et φ).

Afin de tester le modèle des « neurites », nous avons :

- simulé avec le modèle numérique plusieurs jeux de données d'ADC avec différents temps de diffusion (entre 100 et 2000 ms), différentes valeurs de D_{intra} , et différentes longueurs L (nombre de particules $N=10\ 000$),
- utilisé le modèle des « neurites » pour ajuster les différents jeux de données,
- comparé les valeurs de D_{intra} et L initiales et obtenues par la modélisation.

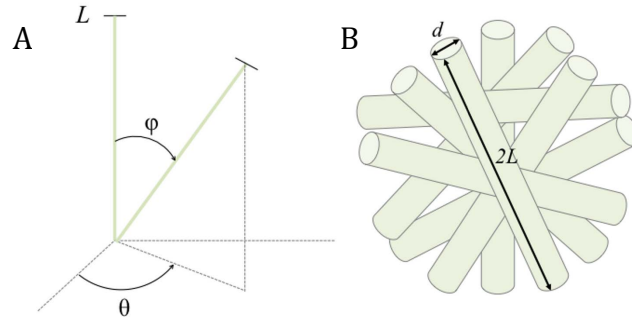


Figure 5.2.1 : Représentation du modèle (A) numérique et (B) analytique développés pour modéliser les données expérimentales.

Les erreurs obtenues sur D_{intra} et L sont faibles (surestimation $<10\%$) pour les différentes combinaisons testées ($D_{intra}=0.2/0.4/0.6 \mu\text{m}^2/\text{ms}$, $L=10$ à $90 \mu\text{m}$) ce qui suggère que le modèle des « neurites » permet en première approximation d'expliquer la diffusion des métabolites dans une structure étoilée comme celle des astrocytes ou des neurones. Nous utiliserons donc ce modèle pour ajuster nos données expérimentales. Nous aurions pu utiliser le modèle numérique pour modéliser nos données expérimentales mais les temps de calcul sont nettement plus longs, ce qui devient rapidement critique lors d'une simulation de Monte Carlo.

5.2.3. Ajustement des données expérimentales

Lors de la modélisation des données expérimentales, deux paramètres ont été ajustés : le coefficient de diffusion « libre » intracellulaire D_{intra} (qui dépend de la tortuosité intracellulaire) et la longueur des cylindres $2L$. Le diamètre des cylindres a été fixé à $3 \mu\text{m}$ (nous avons vérifié préalablement que fixer le diamètre des cylindres n'influence pas significativement la détermination des deux autres paramètres). Une régression des moindres carrés non linéaire a été utilisée pour estimer les paramètres D_{intra} et L qui reflètent au mieux la diffusion des métabolites dans notre voxel. Une limite inférieure sur D_{intra} a été fixée à 2.5 fois la valeur minimale de l'ADC mesuré *in vivo* sur notre gamme de t_d pour chaque métabolite. L'erreur sur l'ajustement des données a été estimée à l'aide d'une approche de Monte Carlo : (1) la déviation standard de la différence entre les données expérimentales et le meilleur ajustement des données est calculée, (2) un bruit aléatoire est généré avec la même déviation standard et est ajouté au meilleur ajustement pour créer un nouveau jeu de données qui (3) est à son tour analysé avec le modèle. Cette opération a été répétée 1000 fois. Nous avons ainsi pu déterminer la densité de probabilité de la longueur L des cylindres pour chaque métabolite.

5.2.4. Résultats

Meilleur ajustement

La figure 5.2.2 montre le meilleur ajustement des données expérimentales obtenu avec le modèle des « neurites » avec des cylindres de longueur finie. Les valeurs de D_{intra} et L sont rapportées dans la table 5.2.1.

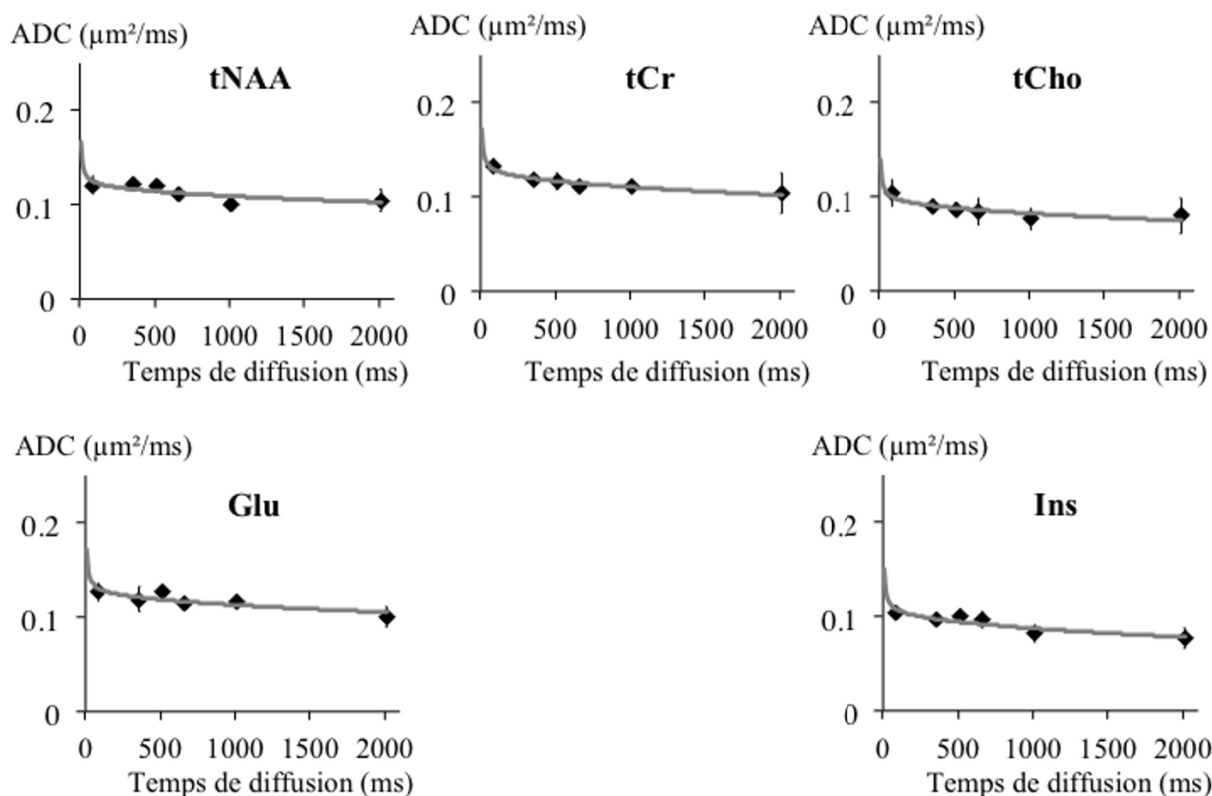


Figure 5.2.2 : ADC des cinq métabolites mesuré à six temps de diffusion ($t_d=86, 361, 511, 661, 1011$ et 2011 ms) et moyenné sur l'ensemble des acquisitions (losange noir) et meilleur ajustement obtenu avec le modèle des « neurites » (gris).

La valeur de D_{intra} obtenue avec le modèle des « neurites » ($0.42 \pm 0.06 \mu\text{m}^2/\text{ms}$) est légèrement plus haute que la valeur moyenne trouvée au chapitre 3 ($0.35 \pm 0.06 \mu\text{m}^2/\text{ms}$) mais reste proche des valeurs de l'ADC dans la direction parallèle à l'axe des fibres rapportées dans la littérature (0.22 - $0.41 \mu\text{m}^2/\text{ms}$) pour les métabolites dans la substance blanche du cerveau de l'Homme (Kroenke et al., 2004 ; Ronen et al., 2013 ; Upadhyay et al., 2007). Nous pouvons également noter une différence de D_{intra} entre les métabolites neuronaux ($0.45 \pm 0.02 \mu\text{m}^2/\text{ms}$) et astrocytaires ($0.36 \pm 0.03 \mu\text{m}^2/\text{ms}$). Enfin, nous pouvons observer une différence dans la longueur des fibres : $L_{tNAA} > L_{Glu} > L_{tCr} > L_{tCho} > L_{Ins}$.

	Modèle des « neurites »	
	D_{intra} ($\mu\text{m}^2/\text{ms}$)	L (μm)
tNAA	0.437	115.3
tCr	0.462	95.2
tCho	0.339	71.0
Glu	0.464	107.1
Ins	0.376	65.6

Table 5.2.1 : D_{intra} et d obtenus avec les modèles des « neurites » pour les cinq métabolites.

Analyse de Monte Carlo

Les distributions de la densité de probabilité de la longueur L pour les cinq métabolites sont représentées sur la figure 5.2.3. On observe une très bonne superposition de la densité de probabilité de la tCho et Ins d'un côté et du tNAA, Glu et tCr d'un autre. La moyenne et déviation standard sur l'ensemble des 1000 valeurs de D_{intra} et L obtenues lors de l'analyse de Monte Carlo sont rapportées dans la table 5.2.2. Les valeurs moyennes de D_{intra} et L sont très proches des valeurs trouvées avec le meilleur ajustement. On retrouve également le même ordre que celui trouvé avec le meilleur ajustement si on classe les longueurs des fibres par valeurs de L décroissante: $L_{tNAA} > L_{Glu} > L_{tCr} > L_{tCho} > L_{Ins}$.

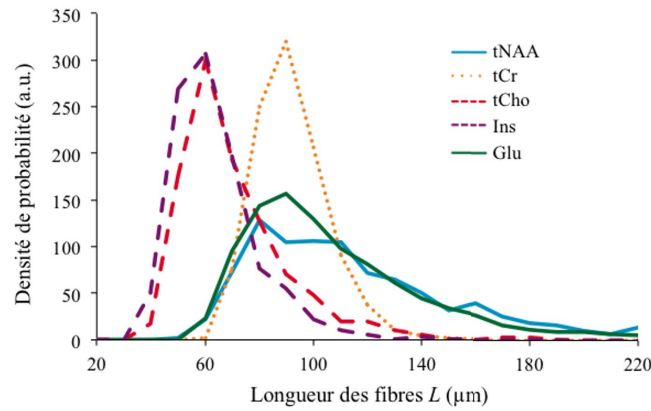


Figure 5.2.3 : Distributions de la densité de probabilité de la longueur L des fibres pour les cinq métabolites obtenues par analyse de Monte Carlo.

	Modèle des « neurites »	
	D_{intra} ($\mu\text{m}^2/\text{ms}$)	L (μm)
tNAA	0.438 ± 0.025	142.3 ± 83.1
tCr	0.462 ± 0.012	96.6 ± 13.2
tCho	0.339 ± 0.017	76.4 ± 25.0
Glu	0.464 ± 0.024	121.7 ± 57.7
Ins	0.376 ± 0.021	68.8 ± 17.1

Table 5.2.2 : D_{intra} et d obtenues avec l'analyse de Monte Carlo (moyenne \pm s.d. des répétitions).

5.2.5. Discussion

Malgré la simplicité de notre modèle pour représenter la structure cellulaire des neurones et des astrocytes, des différences apparaissent entre les deux populations cellulaires. Nous avons pu observer, avec le meilleur ajustement et l'analyse de Monte Carlo, des écarts entre les valeurs de L pour les métabolites neuronaux et les métabolites astrocytaires : $L_{\text{neurone}} > L_{\text{astrocyte}}$. La tCr, présente à la fois dans les neurones et les astrocytes, a un comportement proche de celui des métabolites neuronaux. Les différences de longueur entre les deux populations sont cohérentes avec l'idée que les prolongements neuronaux (dendrites) sont plus longs que les prolongements astrocytaires (Fiala and Harris, 1999 ; Oberheim et al., 2009).

5.3. Conclusion

Cette étude illustre la capacité de la spectroscopie RMN de diffusion à sonder l'espace intracellulaire et à détecter des différences entre les populations neuronales et astrocytaires de manière non invasive et *in vivo*. Mesurer la variation de l'ADC sur une plus large gamme de temps de diffusion (de <1 ms à >10 s) permettrait de caractériser plus précisément la structure cellulaire. Pour cela, il est envisageable d'utiliser des gradients plus forts et des séquences à gradients oscillants (Marchadour et al., 2012) pour l'étude des temps courts ou utiliser des IRM à haut champ, les métabolites marqués au carbone-13 (plus faible interaction dipôle-dipôle, van Heeswijk et al., 2007) ou les états d'aimantation à longue durée de vie (« long-lived states » proches des états « singlets », Ahuja et al., 2009) pour augmenter le temps de relaxation T_1 et réaliser des études aux temps longs. Enfin, pour rendre compte de la complexité cellulaire, il serait nécessaire de développer des modèles plus fidèles.

Une partie de ce travail a été présenté sous la forme d'un poster électronique au congrès de l'ISMRM à Salt Lake City, Etats-Unis en Mai 2013 (poster n°3998).

CONTAMINATION POTENTIELLE DES TERMES CROISES AVEC DES GRADIENTS VARIABLES AUX TEMPS LONGS

A ce stade, bien que cohérent avec les données de la littérature sur l'architecture cellulaire, nos résultats restent entachés d'un doute. L'acquisition des spectres pondérés en diffusion avec des gradients de diffusion positifs puis négatifs permet d'éliminer le biais induit par les gradients constants sur le volume de détection (notamment les gradients d'imagerie, G_{im}). Par contre, les gradients « locaux » induits par les inhomogénéités de champ magnétique et de susceptibilité magnétique non constants dans le volume (G_0) induisent un biais non corrigé. Dans le cerveau, ces gradients « locaux » sont susceptibles d'apparaître au voisinage des structures vascularisées (propriété magnétique de l'hémoglobine), des noyaux gris centraux (contenant du fer) et des gaines de myéline (Zhong et al., 1991 ; Palombo et al., 2014). Dans nos études *in vivo* aux temps longs, nous avons toujours considéré que cette contamination est minime, mais cette hypothèse pourrait ne pas être vérifiée. En 2004, Galvosas et al. ont proposé une séquence pondérée en diffusion basée sur une approche d'écho stimulé modifiée dans le but d'éliminer la contamination due à une variation de G_0 pendant le temps de mélange (c.-à-d. entre la deuxième impulsion et troisième impulsion $\pi/2$) (Galvosas et al., 2004). Dans ce chapitre, nous comparerons cette séquence à la séquence STEAM classique et étudierons son intérêt dans la mesure du coefficient de diffusion aux temps longs.

6.1. Théorie : termes croisés avec des gradients variables

En présence d'un gradient de diffusion G , un gradient G_0 induit par les inhomogénéités et en négligeant les termes de relaxation, la résolution de l'équation de Bloch-Torrey donne l'expression de l'aimantation transversale :

$$\frac{M_{xy}(TE)}{M_0} = \exp(-\gamma^2 D \int_0^{TE} \left[\int_0^{t'} [G(t'') + G_0(t'')] dt'' \right]^2 dt') = \exp(-D \int_0^{TE} [k(t') + k_0(t')]^2 dt') \quad (6.1)$$

où γ est le rapport gyromagnétique et les termes k et k_0 correspondent à l'intégrale des gradients de diffusion (moment d'ordre zéro) et des gradients d'inhomogénéités.

Pour une séquence d'écho de spin stimulé (SSE, stimulated spin-echo), les travaux de Karlicek and Lowe puis de Cotts et al. ont montré que l'atténuation du signal RMN peut s'écrire sous la forme (Karlicek and Lowe, 1980 ; Cotts et al., 1989):

$$\frac{M_{xy}}{M_0} = \xi_p\left(\frac{TE}{2}\right) \xi_s(TM) \xi_r(TE + TM) \quad (6.2)$$

où les indices p , s et r correspondent aux trois périodes de la séquence SSE (figure 6.1.1).

Plusieurs séquences SSE peuvent être générées en fonction de la polarité et du schéma des gradients de diffusion. On peut distinguer deux conditions :

(i) *Condition 1* : les gradients de diffusion effectifs appliqués entre la première et deuxième impulsion $\pi/2$ puis entre la troisième impulsion $\pi/2$ et l'acquisition ont la même polarité :

$$\xi_p\left(\frac{TE}{2}\right) = \exp(-\gamma^2 D \int_0^{\frac{TE}{2}} [G(t'') + G_0(t'')] dt'')^2 = \exp(-D \int_0^{\frac{TE}{2}} [k_p(t')]^2 dt') \quad (6.3)$$

$$\xi_s(TM) = \exp(-D [k_p\left(\frac{TE}{2}\right)]^2 * TM) \quad (6.4)$$

$$\xi_r(TE + TM) = \exp(-\gamma^2 D \int_{\frac{TE}{2}+TM}^{\frac{TE}{2}} \left[\frac{k_p\left(\frac{TE}{2}\right)}{\gamma} - \int_{\frac{TE}{2}+TM}^{t'} [G(t'') + G_0(t'')] dt'' \right]^2 dt') \quad (6.5)$$

(ii) *Condition 2* : les gradients de diffusion effectifs ont une polarité différente (c.-à-d. la polarité du premier gradient est positive tandis que celle du deuxième est négative). Les expressions 6.3 et 6.4 ne changent pas, seul $\xi_r(TE + TM)$ est différent :

$$\xi_r(TE + TM) = \exp(-\gamma^2 D \int_{\frac{TE}{2}+TM}^{\frac{TE}{2}} \left[\frac{k_p\left(\frac{TE}{2}\right)}{\gamma} + \int_{\frac{TE}{2}+TM}^{t'} [G(t'') + G_0(t'')] dt'' \right]^2 dt') \quad (6.6)$$

Enfin, l'expression de l'atténuation du signal RMN peut s'écrire sous la forme :

$$\ln\left(\frac{S}{S_0}\right) = -D \int_0^{TE} [k^2(t') + k k_0(t')] dt' = -bD = -\gamma^2 D (A_p + A_c) \quad (6.7)$$

où S et S_0 sont les signaux RMN acquis avec et sans pondération en diffusion, A_p et A_c sont les expressions des facteurs de pondération du signal liés aux gradients de diffusion seuls et aux termes croisés entre les gradients de diffusion et les gradients d'inhomogénéités et b est le coefficient de pondération en diffusion.

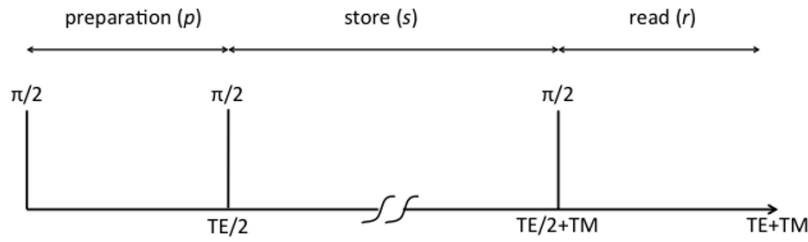


Figure 6.1.1 : Définition des délais de la séquence d'écho stimulé (SSE).

6.1.1. Contribution des termes croisés

Pour la séquence STEAM classique (figure 6.1.2), l'expression de l'atténuation du signal RMN a été calculée par Tanner (Tanner, 1970) dans le cas où les gradients G_0 induits par les hétérogénéités de susceptibilité magnétique et les inhomogénéités de champ magnétique ne varient pas dans le volume où les molécules diffusent :

$$A_p = \delta^2 \left(TM + \frac{TE}{2} - \frac{\delta}{3} \right) G^2 \quad (6.8)$$

$$A_c = \delta \left(TE * TM + 2 * \left(\frac{TE}{2} \right)^2 - \frac{2\delta^2}{3} - \delta(\delta_1 + \delta_2) - (\delta_1^2 + \delta_2^2) \right) G G_0 \quad (6.9)$$

où TM est le temps de mélange, δ est la durée des gradients de diffusion, δ_1 et δ_2 sont les délais entre les impulsions RF et les gradients de diffusion.

L'expression 6.9 montre la dépendance des termes croisés au temps de mélange TM et donc au temps de diffusion. Plus le temps de diffusion est long, et donc plus G diminue pour garder A_p constant, plus la contribution de A_c est importante relativement à A_p . Pour supprimer cette contribution, plusieurs techniques sont envisageables :

- l'acquisition de spectres pondérés en diffusion avec des gradients de diffusion positifs puis négatifs et le calcul de la moyenne géométrique des deux signaux permettent d'éliminer la contamination des termes croisés. C'est la méthode que nous avons choisie pour la mesure de l'ADC chez le macaque et chez l'Homme (chapitres 3, 4 et 5). Elle n'est effective que si le gradient d'inhomogénéité G_0 est constant dans l'espace et le temps.
- Cotts et al., ont proposé plusieurs séquences dans le but de supprimer la contribution de A_c dans le cas où les gradients d'inhomogénéités varient dans l'espace. Pour cela, une ou plusieurs impulsions π sont ajoutées pendant les périodes de préparation (p) et de lecture (r) et des gradients de diffusion sont insérés dans les différents intervalles. On parle alors des séquences 9, 13 et 17 intervalles (correspondant au nombre d'intervalles de temps distincts sur l'ensemble de la séquence). La table 6.1.1 résume l'ensemble des facteurs A_p et A_c calculés

à partir des équations 6.2 à 6.7 (Cotts et al., 1989). Les *conditions 1* et 2 sont définies à partir des gradients effectifs. Ces derniers correspondent donc ici aux gradients dans le repère du laboratoire avec un signe inversé à chaque application d'une impulsion π . Seule la *condition 1* (gradients effectifs de même polarité) permet de supprimer la contribution des termes croisés avec (séquences 9 et 13 intervalles) ou sans (séquence 17 intervalles) condition supplémentaire sur les délais δ_1 et δ_2 .

		A_p/G^2	$A_c/(GG_0)$
Séquence 9 intervalles	<i>Condition 1</i>	$\delta^2 \left(TM + \frac{TE}{4} - \frac{\delta}{3} \right)$	$\delta \frac{TE}{4} (\delta_1 - \delta_2)$
	<i>Condition 2</i>	$\delta^2 \left(TM + \frac{TE}{4} - \frac{\delta}{3} \right)$	$\delta \left(\frac{\delta^2}{3} - \delta \frac{TE}{4} - (\delta_1^2 + \delta_2^2) \right)$
Séquence 13 intervalles	<i>Condition 1</i>	$\delta^2 \left(4 * TM + 6 * \frac{TE}{4} - \frac{2}{3} \delta \right)$	$\frac{TE}{2} * \delta (\delta_1 - \delta_2)$
	<i>Condition 2</i>	$\delta^2 \left(4 * TM + 6 * \frac{TE}{4} - \frac{2}{3} \delta \right)$	$4\delta \left(\frac{TE}{4} \right)^2$
Séquence 17 intervalles	<i>Condition 1</i>	$\delta^2 \left(4 * TM + 20 * \frac{TE}{12} - \frac{2}{3} \delta \right)$	0
	<i>Condition 2</i>	$\delta^2 \left(4 * TM + 20 * \frac{TE}{12} - \frac{2}{3} \delta \right)$	$4\delta \left(\frac{TE}{12} \right)^2$

Table 6.1.1 : Expressions de A_p et A_c pour les séquences 9, 13 et 17 intervalles définies par Cotts et al. (Cotts et al., 1989).

Si la distribution spatiale des gradients d'inhomogénéités est telle que les gradients vus par chaque spin sont différents au début et à la fin de la séquence sous l'effet du déplacement de ces spins, ou si à chaque position les inhomogénéités fluctuent dans le temps, alors les deux méthodes présentées ci-dessus ne permettent pas de corriger la contribution de A_c (figure 6.1.2B). Il semble raisonnable de supposer que plus le temps de diffusion augmente, plus la probabilité pour que les gradients d'inhomogénéités soient différents pendant les deux périodes de préparation (p) et (r) est grande. La mesure d'ADC devient alors sensible aux inhomogénéités. Sun et al. puis Galvosas et al. ont proposé une séquence permettant d'éliminer la contamination induite par des gradients d'inhomogénéités dont l'amplitude change pendant le temps de mélange (c.-à-d. pendant le temps de diffusion). Néanmoins, on doit faire l'hypothèse

que l'amplitude des gradients d'inhomogénéités ne change pas pendant les périodes de préparation et de lecture. Cette approximation est justifiée si le déplacement quadratique moyen pendant ces deux périodes ($\langle (x - x_0)^2 \rangle = \sqrt{2 * D * TE/2}$) est petit par rapport à la longueur caractéristique sur laquelle des changements importants de gradients d'inhomogénéités sont observés (Sun et al., 2003 ; Galvosas et al., 2004).

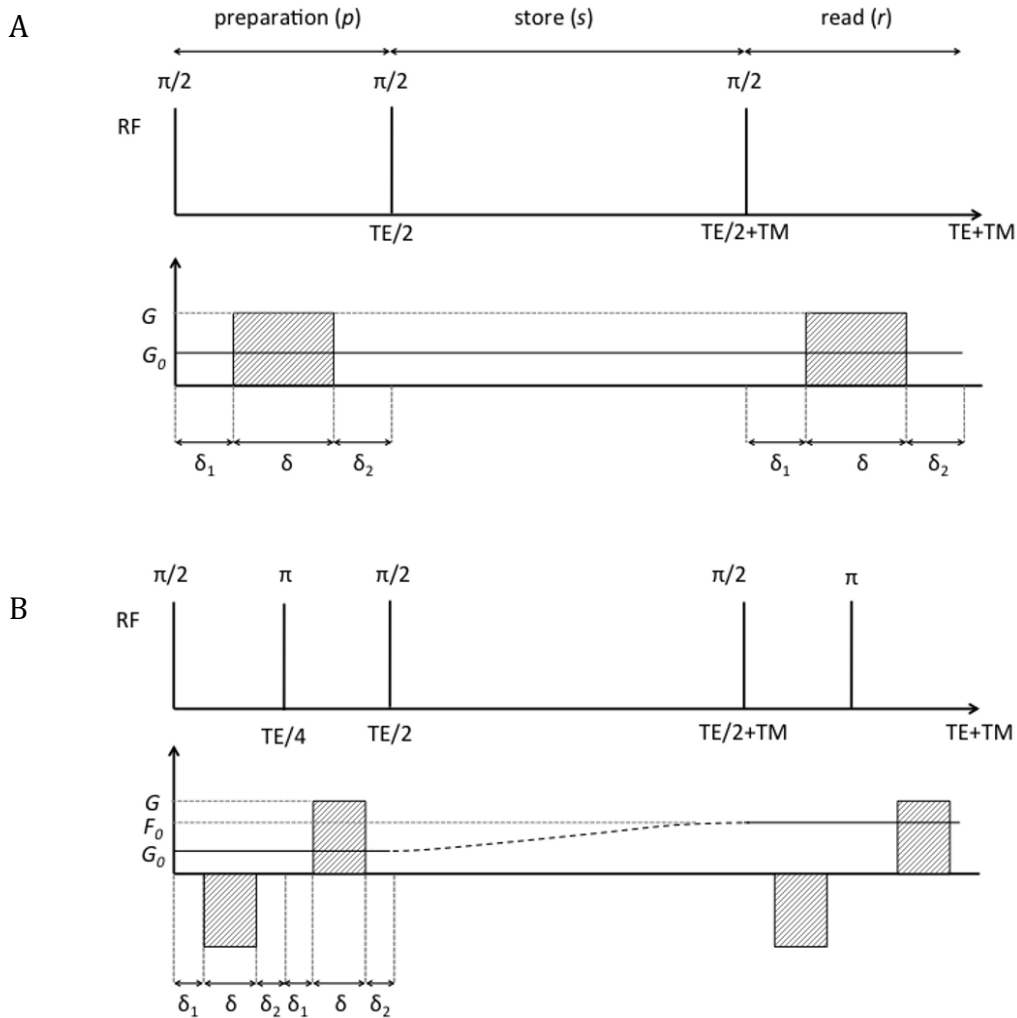


Figure 6.1.2 : (A) Chronogramme de la séquence STEAM pondérée en diffusion avec un gradient G_0 constant. (B) Chronogramme de la séquence 13 intervalles de Cotts et al. avec une variation de l'amplitude du gradient d'inhomogénéités pendant le temps de mélange. Les gradients sont définis dans le repère du laboratoire. G_0 et F_0 sont les gradients d'inhomogénéités pendant les deux périodes de préparation (p) et de lecture (r).

6.1.2. Le coefficient « magique » introduit par Galvosas et al.

Le schéma proposé par Sun et al. puis par Galvosas et al. est une généralisation de la séquence 13 intervalles de Cotts : deux gradients de diffusion d'amplitude F^p, G^p sont appliqués pendant la période de préparation (p) et deux gradients d'amplitude F^r et G^r sont appliqués pendant la période de lecture (r). Les quatre gradients sont de même durée δ (Sun et al., 2003, Galvosas et al., 2004). On note δ_1 le temps entre l'impulsion $\pi/2$ ou π et le début du gradient et δ_2 le temps entre la fin du gradient et l'impulsion $\pi/2$ ou π suivante (avec $\delta_2 = \frac{TE}{4} - \delta - \delta_1$). La résolution de l'équation 6.2 en utilisant les gradients effectifs donne (Galvosas et al., 2004) :

$$A_p = \delta^2 \left\{ \left(TM + \frac{TE}{4} \right) (G^r + F^r)^2 + \frac{TE}{4} [2(F^r)^2 - (F^p + F^r)(G^p - G^r)] - \frac{1}{3} \delta [(G^p)^2 + F^p F^r + G^r (F^p - F^r)] \right\} \quad (6.11)$$

$$A_c = \delta \left\{ G_0 \left[a(G^p - F^p) + 2 \left(\frac{TE}{4} \right)^2 F^p + \frac{TE}{4} (\delta_2 - \delta_1) G^p \right] - F_0 \left[a(G^r - F^r) + 2 \left(\frac{TE}{4} \right)^2 F^r - \frac{TE}{4} (\delta_2 - \delta_1) F^r \right] \right\} \quad (6.12)$$

$$\text{avec } a = \delta_1^2 + \delta_1 \delta + \frac{1}{3} \delta^2$$

La contribution des termes croisés A_c s'annule si (Galvosas et al., 2004):

$$\frac{G^p}{F^p} = \eta_p = \left(a - 2 \left(\frac{TE}{4} \right)^2 \right) / \left(a + \frac{TE}{4} (\delta_2 - \delta_1) \right) \quad (6.13)$$

$$\frac{G^r}{F^r} = \eta_r = 1 - \left(2 \left(\frac{TE}{4} \right)^2 - \frac{TE}{4} (\delta_2 - \delta_1) \right) / a \quad (6.14)$$

Pour observer l'écho de spin, l'intégrale des gradients de diffusion pendant les périodes de préparation et de lecture doivent être égales, soit : $F^p + G^p = F^r + G^r$ (6.15)

De plus, si les gradients de diffusion sont centrés ($\delta_1 = \delta_2$) alors la combinaison des expressions 6.13, 6.14 et 6.15 permet d'introduire η , le coefficient « magique ». Ce coefficient, proposé par Galvosas et al., s'écrit :

$$\eta = \frac{G}{F} = 1 - \left(8 / \left(1 + \frac{1}{3} \left(\frac{\delta}{TE/4} \right)^2 \right) \right) \quad (6.16)$$

avec $G = G^r = G^p$ et $F = F^r = F^p$, et $-7 \leq \eta \leq -5$ (car $0 \leq \delta \leq TE/4$)

Les gradients effectifs F^p et G^p doivent alors être de polarité inversée et de polarité identique à G^r et F^r (figure 6.1.3). Le facteur de pondération induit par les gradients de diffusion seul est plus faible avec la séquence modifiée :

$$A_p = (\delta F^p)^2 \left[\left(TM + \frac{TE}{4} \right) (1 + \eta)^2 + 2 * \left(\frac{TE}{4} \right) - \frac{1}{3} \delta (1 + \eta^2) \right] \quad (6.17)$$

Compte-tenu de la relative complexité de ce formalisme et du fait que cette approche n'a jamais été utilisée *in vivo*, nous avons souhaité nous assurer de la validité de cette séquence par simulation numérique. Nous avons implémenté sur Matlab (The Mathworks, Natick, MA, USA) la séquence définie par Galvosas et al., baptisée MAGSTE en référence au ratio magique et à l'approche par écho stimulé, à laquelle nous avons ajouté des gradients d'inhomogénéités dont l'amplitude change pendant le temps de mélange (figure 6.1.3). Nous avons mesuré l'intégral des gradients de diffusion (k) et d'inhomogénéités (k_0) et les termes croisés (kk_0) par intégration numérique (équation 6.3 à 6.6). Nous avons ainsi pu vérifier pour différentes valeurs de G_0 et F_0 choisies aléatoirement (de quelques mT/m à plusieurs centaines de mT/m), de TE et de TM que la séquence MAGSTE permet de supprimer la contribution des gradients d'inhomogénéités, c.-à-d. l'intégrale des termes croisés est nulle ($A_c=0$) (un exemple est montré à la figure 6.1.3). La puissance de cette séquence repose sur le fait que la contribution des gradients d'inhomogénéités présents pendant la période de préparation est annulée dès la fin de cette période. Ainsi, la suppression des gradients d'inhomogénéités pendant la période de lecture ne dépend ni du temps de mélange (TM) ni de l'amplitude de la variation de ces gradients pendant TM.

Notons tout de même que l'expression 6.16 du coefficient η est correcte uniquement pour des gradients de diffusion de forme rectangulaire (temps de montée nul). En pratique, les gradients sont de forme trapézoïdale ou sinusoïdale. L'expression exacte de η est alors différente (Sun et al., 2004).

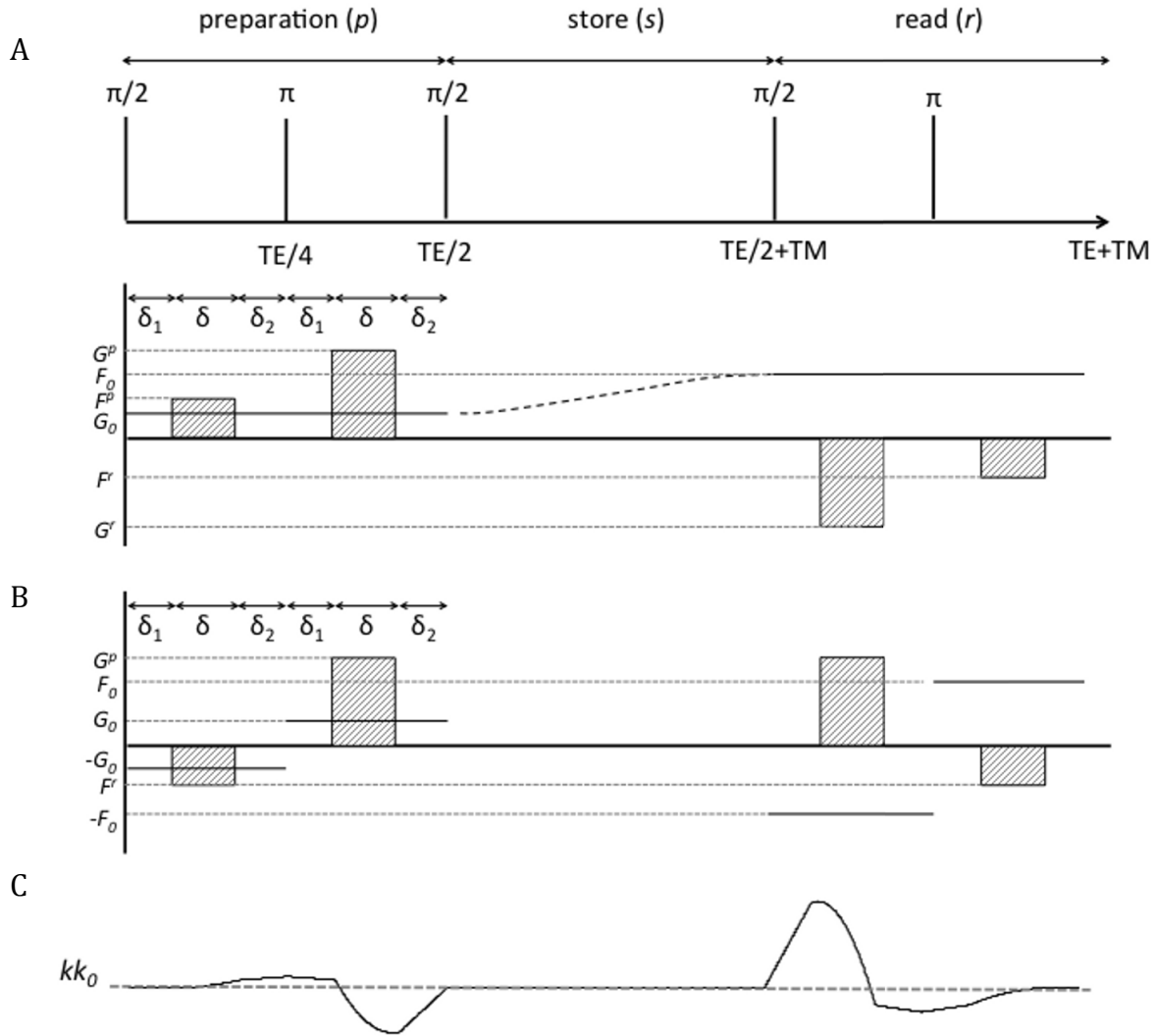


Figure 6.1.3: (A) Chronogramme des gradients et des impulsions radiofréquences de la séquence développée par Galvosas et al. dans le repère du laboratoire, (B) Chronogramme des gradients effectifs et (C) Termes croisés entre les gradients de diffusion et gradients d'inhomogénéités (kk_0) (Galvosas et al., 2004).

6.2. Application de la séquence MAG-STEAM localisée *in vitro* et *in vivo*

Afin de mesurer le coefficient de diffusion des métabolites dans un volume localisé, nous avons ajouté à la séquence de Galvosas des gradients d'imagerie (gradients de sélection de coupe, de crusher et de refocalisation sur les trois axes x , y et z) localisant le signal dans un volume avec les trois impulsions $\pi/2$, à l'instar d'une séquence STEAM. Nous avons également ajouté des gradients de spoiling de part et d'autres des impulsions π afin de détruire l'aimantation transversale résiduelle si ces dernières ne sont pas parfaites. A notre connaissance, c'est la première fois que l'approche MAGSTE est combinée avec une localisation de volume d'intérêt.

Nous baptiserons cette séquence MAG-STEAM. Afin de valider cette séquence, nous avons d'abord réalisé des simulations sur Matlab (The Mathworks, Natick, MA, USA) puis des acquisitions *in vitro* et *in vivo*.

6.2.1. Séquence MAG-STEAM localisée

Les gradients de sélection de coupe (appliqués selon les trois directions x , y et z pendant l'émission des trois impulsions radiofréquence $\pi/2$) et de crusher ont été ajoutés à la séquence de la même manière que pour la séquence STEAM utilisée dans nos études précédentes (figure 3.1.1). En revanche, l'ajout des deux impulsions π nécessite de modifier le signe des gradients de refocalisation. Ces derniers permettent de rétablir la phase de l'aimantation transversale des spins excités par les impulsions $\pi/2$ qui ont été déphasés par les gradients de sélection de coupe.

Signe des gradients de refocalisation de la séquence MAG-STEAM localisée

Pour la séquence STEAM, le signe des gradients de refocalisation dans la direction x et y et des gradients de sélection de coupe sont identiques tandis que le signe du dernier gradient (appliqué selon z) est de signe opposé (figure 3.1.1). Pour la séquence MAG-STEAM, on pourrait donc intuitivement penser que l'ajout des deux impulsions π nécessite d'inverser le signe des gradients de refocalisation dans les directions y et z . Cependant, ce schéma ne permet pas de refocaliser la phase de l'aimantation des spins et induit une perte de signal significative. Dans le but de déterminer le signe des gradients de refocalisation, nous avons implémenté le module de localisation (gradients de sélection de coupe, de crusher et de refocalisation) et le chronogramme des impulsions radiofréquence sur Matlab, simulé la précession de l'aimantation d'un ensemble de spins contenus dans un volume et mesuré l'aimantation transversale macroscopique résultante. Pour un schéma STEAM classique, l'introduction des gradients de crusher (permettant de ne conserver que l'écho stimulé) induit une perte de signal d'un facteur 2. Pour une séquence MAG-STEAM avec des gradients de refocalisation calibrés correctement le même facteur doit être retrouvé. Cette simulation nous a permis de trouver que les gradients de refocalisation selon x et z doivent être de signe opposé aux signes des gradients de sélection de coupe correspondant tandis que le signe du gradient selon y doit être identique. Le chronogramme complet de la séquence MAG-STEAM est donné à la figure 6.2.1.

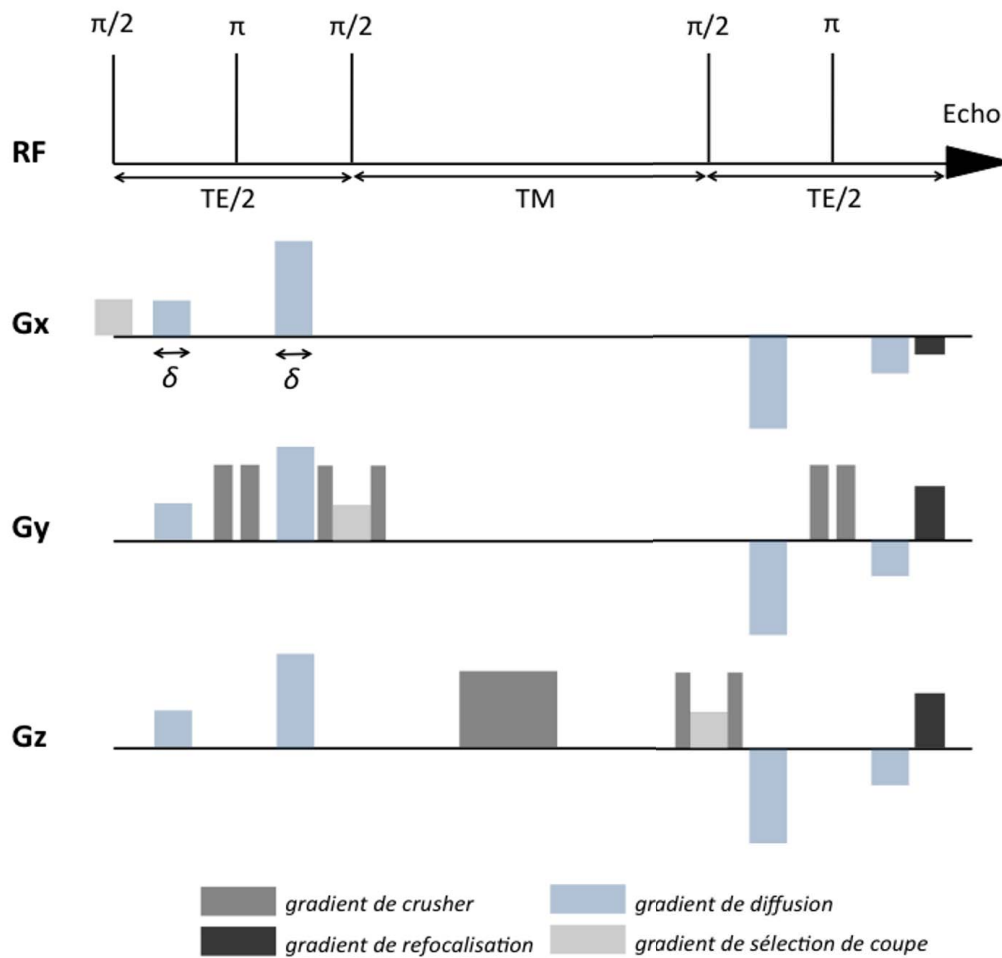


Figure 6.2.1 : Chronogramme de la séquence MAG-STEAM localisée avec les gradients de localisation (gris clair), de refocalisation (noir), de crushers (gris foncé) et les gradients de diffusion (bleu).

Correction des termes croisés entre les gradients de diffusion et les gradients d'imagerie

L'utilisation de la séquence de Galvosas et al. permet de supprimer la contribution des termes croisés entre les gradients de diffusion et les gradients d'inhomogénéités dont l'amplitude varie pendant le temps de mélange mais qu'en est-il des termes croisés entre les gradients de diffusion et les gradients d'imagerie ? Pour répondre à cette question, nous avons mesuré sur Matlab l'intégrale des gradients de diffusion (k) et d'imagerie (k_{im}) de la séquence ainsi que les termes croisés (kk_{im}) par intégration numérique (équation 6.3 à 6.6 où G_0 est simplement remplacé par G_{im}) et vérifié si l'intégrale des termes croisés s'annule. Comme illustrée sur la figure 6.2.2, on peut remarquer que le schéma actuel ne permet pas de supprimer la contribution des gradients d'imagerie (l'intégrale des termes croisés est non nulle). Pour cela, nous proposons d'adopter la même approche que pour la séquence STEAM *in vivo*, c.-à-d. acquérir les spectres pondérés en diffusion avec la séquence MAG-STEAM localisée puis à nouveau en inversant la polarité des gradients de diffusion. En effet, les termes croisés selon les

trois directions x , y , et z , mesurés avec la séquence de diffusion de base sont exactement égaux mais de signe opposé aux termes croisés mesurés avec une polarité inversée des gradients de diffusion. Le calcul de la moyenne géométrique du signal permet alors de supprimer la contamination (figure 6.2.2).

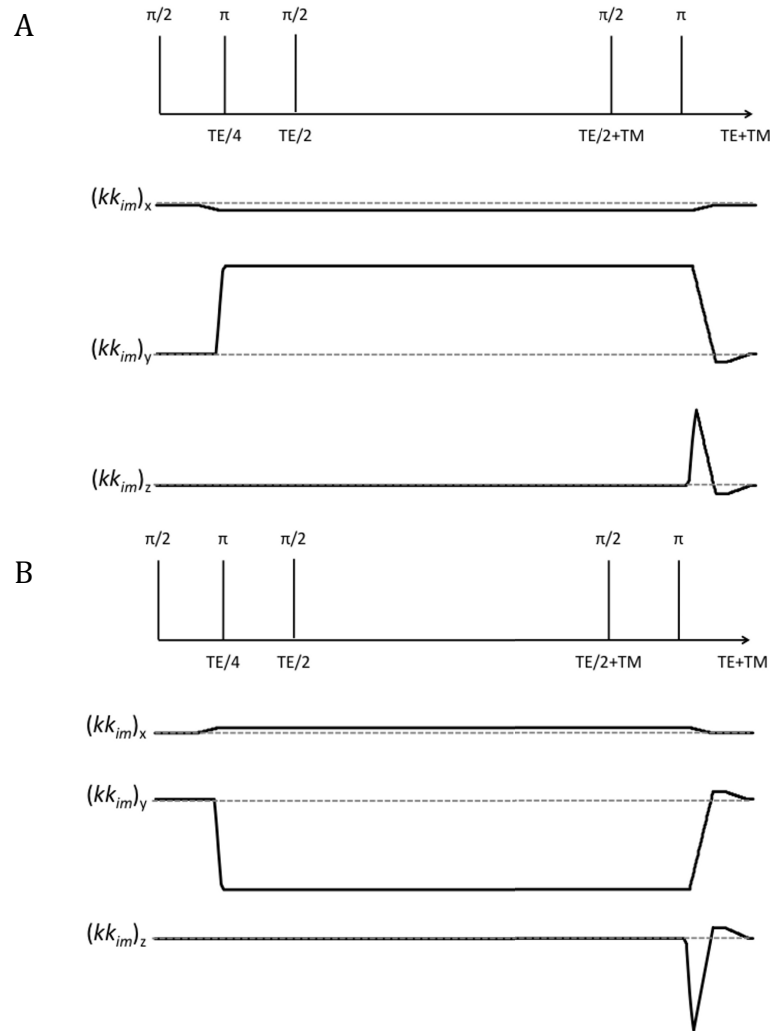


Figure 6.2.2 : (A) Termes croisés entre les gradients d'imagerie (gradients de sélection de coupe, de crusher et de refocalisation) et les gradients de diffusion selon les trois directions x , y et z avec la séquence MAG-STEAM localisée (figure 6.2.1) puis (B) avec une polarité inversée des gradients de diffusion.

6.2.2. Validation de la séquence MAG-STEAM *in vitro*

Protocole expérimental

Nous avons validé la séquence *in vitro* à l'aide d'un fantôme d'huile de silicone (Sigma Aldrich). Ce fantôme présente deux avantages : le coefficient de diffusion du silicone est proche de celui

des métabolites *in vivo* ($D \sim 0.21 \mu\text{m}^2/\text{ms}$) et la viscosité de l'huile (5 cSt à 25°C) permet d'éviter les artéfacts de vibrations souvent observés avec des fantômes d'eau classique. Les expériences ont été réalisées sur l'IRM 7 T Agilent (Palo Alto, CA, USA) de MIRCen en configuration rongeur (ce qui nous permet de limiter le temps d'écho). Nous avons utilisé une antenne ^1H volumique pour l'émission et une antenne ^1H de surface pour la réception radiofréquence (Rapid Biomedical). Nous avons acquis des spectres de l'eau ($\text{TR}/\text{TE}=2800/25$ ms, signal sommé sur 8 acquisitions) avec plusieurs valeurs de b (0 à 1000 s/mm^2 avec un pas de 100 s/mm^2 , durée des gradients $\delta=2$ ms), cinq valeurs de TM (100, 250, 500, 750 et 1000 ms) avec les deux séquences STEAM et MAG-STEAM dans un petit voxel de $4 \times 4 \times 4 \text{ mm}^3$. Nous avons également acquis, avec les deux séquences, les spectres pondérés en diffusion avec une polarité des gradients de diffusion inversée afin de corriger le biais introduit par les termes croisés avec les gradients d'imagerie. Le signal de l'huile de silicone sur les spectres avec et sans pondération en diffusion a été mesuré à partir de l'aire sous le pic de la résonance. Nous avons ensuite calculé la moyenne géométrique du signal mesuré pour les deux polarités. Enfin, l'ADC est mesuré par régression linéaire du logarithme de l'atténuation de la moyenne géométrique du signal en fonction de b .

Résultats

La figure 6.2.3 illustre la variation du signal de l'huile de silicone en fonction de b . Les termes croisés entre les gradients d'imagerie et de diffusion induisent un biais important lorsque le temps de diffusion augmente (c.-à-d. quand le temps de mélange augmente) avec les deux séquences STEAM et MAG-STEAM. Ce biais est corrigé par l'acquisition des spectres pondérés en diffusion avec deux polarités et le calcul de la moyenne géométrique du signal mesuré avec chaque polarité. Les valeurs d'ADC mesurées sont rapportées dans la table 6.2.1. Pour les deux séquences, les valeurs d'ADC sont similaires et proches des valeurs théoriques attendues : $\text{ADC}_{\text{STEAM}}=0.21 \pm 0.02 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ et $\text{ADC}_{\text{MAG-STEAM}}=0.20 \pm 0.01 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ (moyenne \pm s.d. sur les différents valeurs de TM).

Conclusion

En absence d'hétérogénéités de susceptibilité magnétique, les deux séquences STEAM et MAG-STEAM donnent des valeurs d'ADC similaires validant ainsi l'implémentation de la séquence MAG-STEAM. Néanmoins, on peut noter une augmentation progressive de l'ADC mesuré avec la séquence STEAM alors que l'ADC mesuré avec la séquence MAG-STEAM reste relativement stable. Cela peut éventuellement être dû à une légère variation de la phase des spectres qui ont été directement sommés sans correction en phase et en fréquence sur la console Vnmrj (Palo Alto, CA, USA).

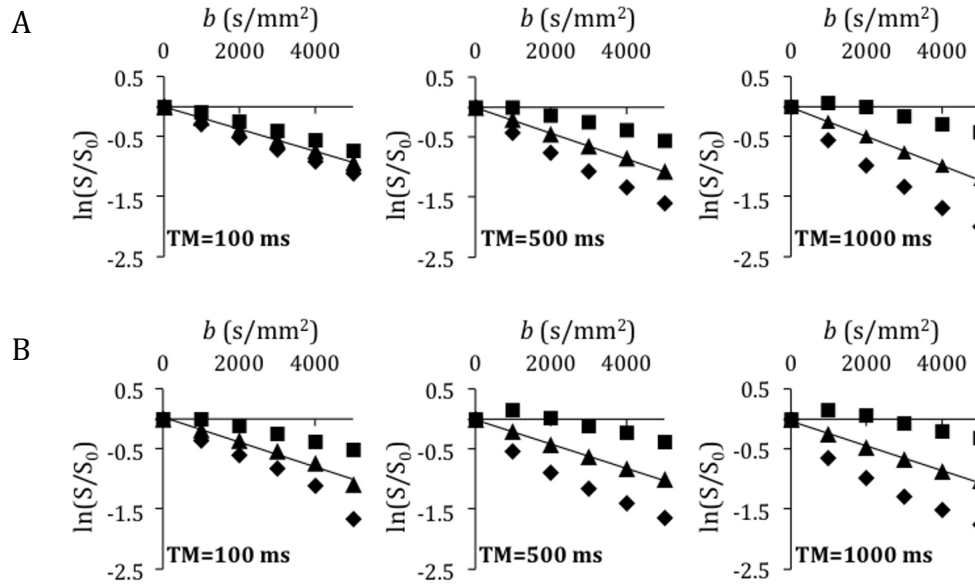


Figure 6.2.3 : Variation du logarithme de l'atténuation du signal en fonction de b pour trois temps de mélange ($TM=100$, 500 et 1000 ms) pour les séquences STEAM (A) et MAG-STEAM (B) (triangle). Les spectres ont été acquis avec une polarité de gradient inversée (carré) puis, la moyenne géométrique du signal dans les deux conditions a été calculée (triangle). La droite représente la régression linéaire du logarithme de l'atténuation du signal.

	TM=100 ms	TM=250 ms	TM=500 ms	TM=750 ms	TM=1000 ms
STEAM	0.19	0.20	0.21	0.23	0.24
MAG-STEAM	0.21	0.20	0.20	0.21	0,21

Table 6.2.1 : ADC ($\mu\text{m}^2/\text{ms}$) de l'huile de silicone obtenu par régression linéaire pour les deux séquences STEAM et MAG-STEAM.

6.2.3. Comparaison des séquences STEAM et MAG-STEAM *in vivo* à 11.7 T

Après avoir validée la séquence MAG-STEAM *in vitro* sur l'aimant 7 T Agilent, nous avons implémenté cette séquence sur l'IRM 11.7 T Bruker (Bruker Biospin, Ettlingen, Allemagne). Ce nouvel aimant équipé d'une cryo-sonde (Bruker), installé à MIRCen en décembre 2013, ouvre de nouvelles perspectives pour l'étude de la dépendance de l'ADC des métabolites au temps de diffusion. L'intensité plus forte des gradients ($G_{\text{max}}=750$ mT/m) et l'augmentation du rapport signal-sur-bruit (plus haut champ magnétique et cryo-sonde) nous permet en effet de couvrir une gamme de temps de diffusion plus large. Cependant, l'augmentation du champ magnétique induit des hétérogénéités de susceptibilité magnétique plus importante ($G_0 \propto B_0 * \Delta\chi$ où $\Delta\chi$ correspond à la différence de susceptibilité magnétique). Il est donc possible qu'aux temps de

diffusion très longs, la mesure d'ADC sur l'IRM 11.7 T soit biaisée (plus significativement que dans nos études à 7 T). Nous avons donc comparé les deux séquences, STEAM et MAG-STEAM, *in vivo* dans le cerveau de la souris. Les molécules d'eau diffusent dans le milieu intra- et extracellulaire et plus rapidement que les métabolites. Elles diffusent donc plus loin pour un même temps de diffusion, elles sont donc potentiellement plus sensibles à des variations des gradients d'inhomogénéités. Par conséquent, afin de tester nos deux séquences dans le cas le plus défavorable, nous avons mesuré l'ADC de l'eau *in vivo* avec plusieurs temps de diffusion.

Protocole expérimental

Les expériences ont été réalisées sur une souris C57BL/6 saine. La souris a été anesthésiée à l'isoflurane (<1.5%) dans un mélange d'air et d'oxygène (1:1) et positionnée dans un cadre stéréotaxique. Nous avons utilisé une antenne ^1H volumique pour l'émission et une antenne ^1H surfacique (cryo-sonde) pour la réception radiofréquence (Bruker). Les spectres de l'eau ont été acquis dans un large voxel ($6.5 \times 3 \times 5 \text{ mm}^3$) couvrant une très large région du cerveau de la souris (figure 6.2.4). Les spectres localisés (TR/TE=3000/28 ms) ont été acquis avec les deux séquences à trois temps de diffusion (obtenus en variant le temps de mélange, $T_M=100, 500, 1000 \text{ ms}$) et avec plusieurs valeurs de b (0 à 1000 s/mm^2 avec un pas de 100 s/mm^2 , durée des gradients $\delta=2 \text{ ms}$). Les spectres pondérés en diffusion ont également été acquis avec une polarité de gradient inversée afin de corriger le biais introduit par les termes croisés entre les gradients de diffusion et les gradients d'imagerie. Le signal de l'eau sur chaque spectre a été mesuré à partir de l'aire sous le pic de la résonance. Puis, la moyenne géométrique du signal mesuré pour chaque polarité a été calculée. Enfin, l'ADC est mesuré par régression linéaire du logarithme de l'atténuation de la moyenne géométrique du signal en fonction de b .

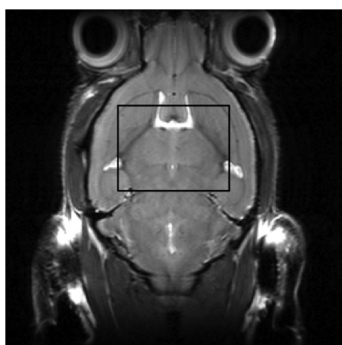


Figure 6.2.4 : Position du voxel ($6.5 \times 3 \times 5 \text{ mm}^3$) dans le cerveau d'une souris C57BL/6.

Résultats

La figure 6.2.5 illustre la variation du logarithme de l'atténuation du signal en fonction de b pour les deux polarités des gradients de diffusion et la moyenne géométrique pour les deux

séquences. La table 6.2.2 résume l'ensemble des valeurs d'ADC mesurées par régression linéaire aux trois temps de diffusion. Les deux séquences donnent des valeurs identiques aux deux premiers temps de diffusion et très proches à $T_M=1000$ ms ($\sim 4\%$ de différence). On peut observer que l'ADC de l'eau est plus élevé à $T_M=100$ ms par rapport à $T_M=500$ et 1000 ms. Néanmoins, à $T_M=100$ ms, l'atténuation du signal en fonction de b montre un comportement légèrement bi-exponentiel. Si seules les valeurs de b supérieures à 400 s/mm² sont utilisées alors $ADC=0.6$ $\mu\text{m}^2/\text{ms}$ ce qui est plus proche des valeurs trouvées à $T_M=500$ et 1000 ms.

Discussion

In vivo dans le cerveau de la souris, les valeurs de l'ADC de l'eau sont légèrement plus basses que les valeurs de la littérature chez le rat (Dijkhuisen et al., 1999 ; Abe et al., 2000 ; Dreher et al., 2001). Cependant, les temps de diffusion utilisés dans la littérature sont plus bas (<30 ms) expliquant certainement l'écart avec nos mesures.

Deux hypothèses peuvent expliquer l'absence de différence entre les valeurs de l'ADC mesurées avec la séquence STEAM et MAG-STEAM. Ces deux séquences sont équivalentes si :

- *Hypothèse 1* : les gradients d'inhomogénéités dans le cerveau de la souris varient peu spatialement si bien que sur la gamme de temps utilisée, l'amplitude des gradients d'inhomogénéités varie peu ou pas au cours du temps de mélange, les ADC mesurés avec la séquence STEAM aux temps longs ne seraient alors pas biaisés, comme la MAG-STEAM.
- *Hypothèse 2* : au contraire, les gradients d'inhomogénéités varient beaucoup et rapidement. L'amplitude des gradients change alors au sein même des périodes de préparation et de lecture (c.-à-d. l'hypothèse selon laquelle le déplacement quadratique moyen pendant les périodes de préparation et de lecture ($\langle (x - x_0)^2 \rangle = \sqrt{2 * D * TE/2}$) est petit par rapport à la longueur caractéristique sur laquelle des changements importants de gradients d'inhomogénéités sont observés n'est pas vérifiée). La séquence MAG-STEAM ne permettrait alors pas de corriger ce biais, et les deux séquences sont alors biaisées identiquement.

Dans les deux situations, il est impossible de différencier les séquences STEAM et MAG-STEAM et de conclure sur la nécessité d'utiliser la séquence MAG-STEAM sur une gamme de temps de diffusion plus grande que celle utilisée. Des mesures supplémentaires avec des temps de diffusion plus longs pourraient éventuellement permettre de différencier les deux séquences si l'hypothèse 1 est vraie. De même, afin de valider l'hypothèse 2, il est envisageable d'utiliser des temps d'écho plus court avec la séquence MAG-STEAM afin d'observer ou non un biais plus ou moins important. Rappelons que le cas étudié ici (diffusion de l'eau) est le plus défavorable (l'eau diffuse plus vite, dans le milieu intra- et extracellulaire et peut traverser la membrane plasmique). La mesure du coefficient de diffusion des métabolites est moins « critique » : les métabolites diffusent plus lentement et majoritairement dans le milieu intracellulaire. Une étude

réalisée avec des capillaires de verre a montré que les différences de susceptibilité magnétique entre l'eau et le verre créent des gradients d'inhomogénéités plus faibles à l'intérieur des capillaires qu'à l'extérieur (Han et al., 2011). Dans le cerveau, les métabolites sont donc moins sensibles aux hétérogénéités de susceptibilité (liées à la présence de myéline autour des axones) que les molécules d'eau qui diffusent dans le milieu extracellulaire.

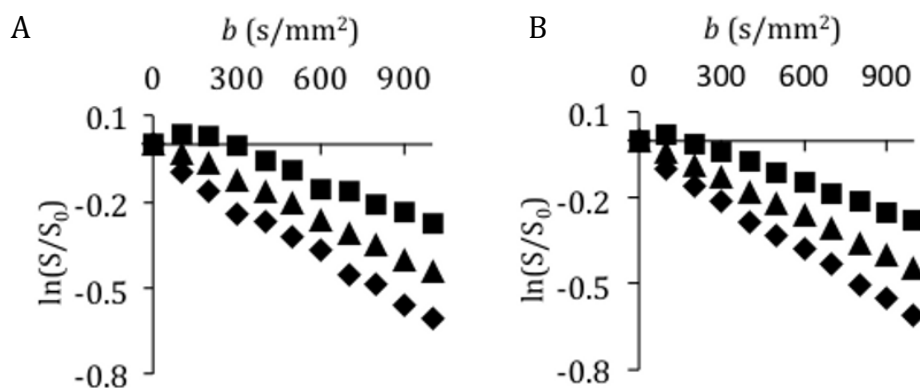


Figure 6.2.5 : Variation du logarithme de l'atténuation du signal de l'eau en fonction de b pour $TM=1000$ ms pour les séquences STEAM (A) et MAG-STEAM (B) (losange), pour une polarité de gradient inversée (carré) et pour la moyenne géométrique du signal mesuré les deux conditions (triangle).

	TM=100 ms	TM=500 ms	TM=1000 ms
STEAM	0.74	0.51	0.45
MAG-STEAM	0.74	0.50	0.47

Table 6.2.2 : ADC ($\mu\text{m}^2/\text{ms}$) mesuré par régression linéaire pour les deux séquences STEAM et MAG-STEAM.

6.3. Conclusion

La contribution des termes croisés entre les gradients de diffusion et les gradients d'inhomogénéités est potentiellement importante lorsque les temps de diffusion utilisés sont longs. L'utilisation de la séquence MAG-STEAM développée par Galvosas (Galvosas et al., 2004) pourrait permettre de corriger cet artéfact. Cette séquence présente donc un intérêt potentiel dans l'étude des temps de diffusion ultra-long. Afin de tester cette hypothèse, nous avons implémenté sur l'IRM 7T puis 11.7 T la séquence de Galvosas à laquelle nous avons ajouté des gradients d'imagerie afin de réaliser une mesure localisée. Cette séquence a été validée *in vitro*,

testée *in vivo* et comparée à la séquence STEAM classique. Les mesures réalisées dans le cerveau de la souris à 11.7 T montrent que la valeur du coefficient de diffusion de l'eau est identique avec la séquence STEAM (sensible aux variations des gradients d'inhomogénéités pendant le temps de mélange) et la séquence MAG-STEAM. Cette observation nous permet de conclure que la mesure de l'ADC des métabolites à 7 T sur la gamme de temps considérée (jusqu'à $t_d=1$ s) n'est pas ou peu biaisée par les termes croisés entre les gradients de diffusion et les gradients d'hétérogénéités de champ magnétique dont l'amplitude varie pendant le temps de mélange, à condition qu'elle reste stable « par morceaux », entre la première et deuxième impulsion $\pi/2$ (période préparation) d'une part, et entre la troisième impulsion $\pi/2$ et l'acquisition (période de lecture) d'autre part.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La spectroscopie RMN pondérée en diffusion est un outil puissant permettant d'accéder à de nombreuses informations sur la microstructure cellulaire. En particulier, l'étude de la dépendance du coefficient de diffusion (ADC) des métabolites au temps de diffusion permet de quantifier la viscosité intracellulaire, la distance inter-obstacles, la tortuosité, la taille des cellules et de définir le compartiment dans lequel ils diffusent. Pour cela, il est nécessaire de couvrir une très large gamme de temps de diffusion : des temps très courts (<1 ms) aux temps très longs (plusieurs secondes).

Au cours de ce travail de thèse, nous avons étudié les temps de diffusion longs (entre 86 ms et 2011 ms). Nous avons pu observer que les métabolites neuronaux et astrocytaires diffusent dans de très longues fibres et ne sont majoritairement pas confinés dans le corps cellulaire ou les organelles (noyau, mitochondries...) aussi bien dans la substance blanche que dans la substance grise. De plus, nous avons montré que des temps de diffusion très longs sont nécessaires pour estimer la longueur des fibres. Pour des temps de diffusion de l'ordre de 2 secondes, des différences significatives apparaissent entre les métabolites neuronaux et astrocytaires. En effet, l'utilisation de modèles analytiques de la structure cellulaire laisse à penser que les prolongements neuronaux (~ 110 μm) sont plus longs que les prolongements astrocytaires (~ 70 μm), tels qu'extraits de nos données. Ces travaux chez le macaque et l'Homme ont été réalisés à la suite des travaux à temps très courts menés chez le rat au laboratoire (Marchadour et al., 2012). La figure 7.1 résume l'ensemble des résultats. On peut observer une bonne continuité des données malgré les différences méthodologiques et d'espèces. En effet, la puissance des gradients (600 mT/m pour l'étude chez le rat, 100 mT/m chez le macaque et 40 mT/m chez l'Homme) ne nous a pas permis d'étudier les temps courts chez le macaque et l'Homme tandis que la « relativement » faible intensité du champ magnétique (7 T) a limité les temps de diffusion longs accessibles dans l'étude chez le rat. L'arrivée à MIRCen en décembre 2013 d'un nouvel aimant 11.7 T Bruker (Bruker Biospin, Ettlingen, Allemagne) équipé de gradients d'une amplitude maximale de 750 mT/m et d'une cryo-sonde (Bruker) ouvre de nouvelles perspectives dont l'étude de l'ensemble de la dynamique temporelle de l'ADC dans le cerveau d'une seule espèce : la souris.

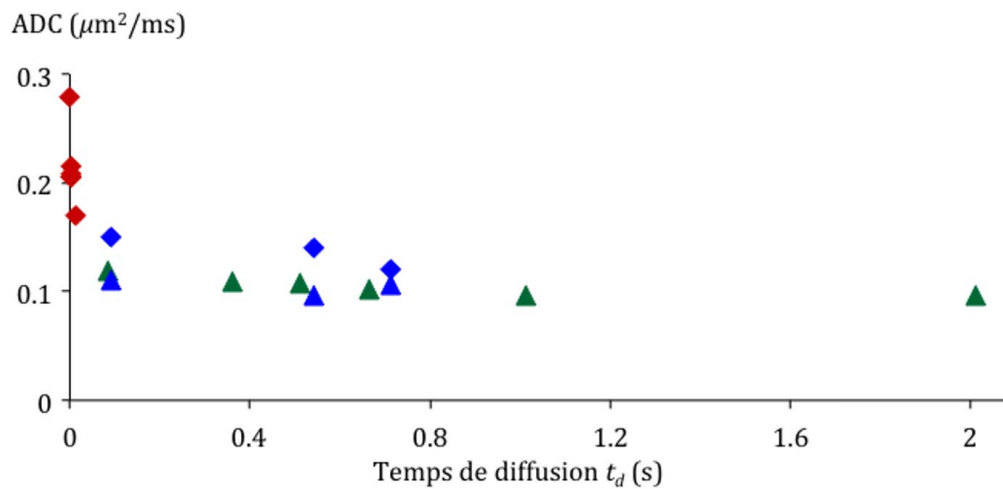


Figure 7.1 : Variation la moyenne de l'ADC du tNAA, tCr et tCho en fonction du temps chez le rat (rouge) (Marchadour et al., 2012), le macaque (vert) et dans la substance blanche (losange bleu) et substance grise (triangle bleu) de l'Homme.

La séquence STEAM pondérée en diffusion (TR/TE=3000/10 ms) a été implémentée sur l'IRM 11.7 T. Le bon rapport signal-sur-bruit lié au haut champ magnétique et à la cryo-sonde, ainsi que l'augmentation du T_1 à 11.7 T, sont *a priori* très favorables à la mesure de l'ADC aux t_d longs. Nous avons ainsi pu récemment mesurer l'ADC de six métabolites (tNAA, tCr, tCho, Glu, Ins, Tau) dans le cerveau de deux souris C57BL/6 à trois temps de diffusion $t_d \sim 104, 504$ et 1004 ms. La figure 7.2. illustre la qualité des spectres obtenus à $t_d \sim 1004$ ms. Le traitement des données est le même que celui utilisé dans l'étude chez le macaque à l'exception des macromolécules dont le spectre n'est pas soustrait à celui des métabolites avant l'analyse LCModel mais inclus dans la base. Le rapport signal-sur-bruit obtenu au temps de diffusion le plus long est équivalent à celui mesuré dans le cerveau du macaque. Les valeurs de l'ADC du tNAA, tCr, tCho, Glu et Tau sont relativement proches à $t_d=504$ ms et $t_d=1004$ ms et sont plus élevées à $t_d=104$ ms (table 7.1). A l'opposé, les valeurs de l'ADC du Ins sont semblables à $t_d=104$ ms et $t_d=1004$ ms alors que l'ADC au point intermédiaire est plus faible. La quantification du signal de ce métabolite est plus délicate ce qui peut expliquer les variations observées. En effet, le signal du Ins est proche du signal de l'eau. Ainsi, une mauvaise suppression du signal de l'eau peut rapidement affecter le signal du Ins et donc biaiser la valeur de l'ADC. Des expériences supplémentaires sont en cours pour augmenter la précision de ces valeurs.

La stabilité de l'ADC aux temps de diffusion longs suggère que la mesure par spectroscopie de diffusion est sensible au coefficient de diffusion intracellulaire D_{intra} le long des fibres (puisque l'ADC tend vers une valeur asymptotique non nulle $\sim D_{intra}/3$). Cette technique pourrait ainsi permettre de quantifier des altérations de la viscosité et tortuosité intracellulaire comme

observées dans certaines maladies neurodégénératives (Arrasate and Finkbeiner, 2012 ; Meraz-Rios et al., 2013). Par exemple, l'application de cette même séquence à des modèles de souris transgéniques de la maladie d'Alzheimer (MA) ou Huntington (MH) développés au laboratoire pourrait permettre de détecter les variations de la viscosité intracellulaire dues à une accumulation de tau hyperphosphorylé (MA) ou huntingtine mutée (MH). De même, les mesures réalisées chez l'Homme montre le potentiel de cette technique en clinique.

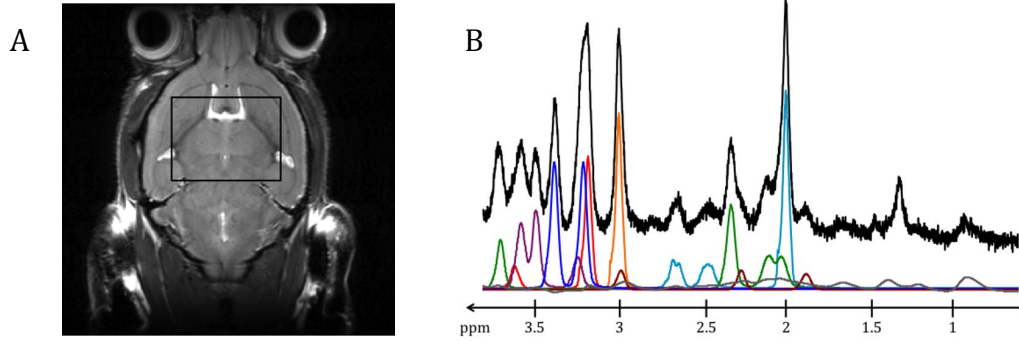


Figure 7.2 : Spectre acquis *in vivo* dans le cerveau de la souris et décomposition LCMoDel (A) avec la séquence STEAM ($TR/TE/TM=3000/10/1000$ ms, $b=0$ s/mm², $\delta=2$ ms, 128 répétitions) dans un large voxel (B). Sur la décomposition LCMoDel on distingue : le tNAA (bleu clair), tCr (orange), tCho (rose), Glu (vert), Ins (violet), Tau (bleu foncé), GABA (marron) et les macromolécules (gris).

	ADC ($\mu\text{m}^2/\text{ms}$) $t_d=104$ ms	ADC ($\mu\text{m}^2/\text{ms}$) $t_d=504$ ms	ADC ($\mu\text{m}^2/\text{ms}$) $t_d=1004$ ms
tNAA	0.076 ± 0.006	0.067 ± 0.006	0.062 ± 0.006
tCr	0.091 ± 0.008	0.069 ± 0.002	0.063 ± 0.002
tCho	0.063 ± 0.013	0.050 ± 0.006	0.038 ± 0.002
Glu	0.091 ± 0.008	0.073 ± 0.008	0.067 ± 0.005
Ins	0.080 ± 0.000	0.055 ± 0.007	0.085 ± 0.007
Tau	0.106 ± 0.004	0.082 ± 0.009	0.082 ± 0.005

Table 7.1 : ADC des métabolites mesuré pour chaque t_d (moyenne \pm s.d, $N=2$) dans un large voxel dans le cerveau de la souris.

Néanmoins, afin de rendre cette technique plus à même de quantifier la longueur des fibres, ce qui pourrait être extrêmement intéressant pour détecter l'atrophie ou l'hypertrophie des neurones et astrocytes, il est nécessaire d'élargir encore la plage des temps de diffusion. La séquence STEAM ne permet pas d'avoir un rapport signal-sur-bruit suffisant pour étudier les

temps de diffusion supérieurs à 2 secondes. D'autres approches sont alors envisageables : étudier la diffusion de métabolites marqués au ^{13}C qui présentent un T_1 très long (en particulier glutamate C5 ou C1, $T_1 \sim 10$ s, van Heeswijk et al., 2007) ou utiliser des états d'aimantation à longue durée de vie (« long-lived states »), proches des états « singlets » (Carravetta and Levitt, 2004 ; Ahuja et al., 2007 ; Sarkar et al., 2008 ; Cavadini et al., 2008). La deuxième approche paraît très prometteuse et permet en théorie de couvrir des temps de diffusion de plusieurs secondes voire plusieurs minutes. Pour cela, les spins sont conservés dans des états « singlets », qui sont des états quantiques de spin total nul, n'ayant donc pas d'interaction magnétique avec l'environnement, et dont le temps de relaxation T_s (« singlet lifetime ») est beaucoup plus long que les temps de relaxation longitudinale et transversale T_1 et T_2 . Certains métabolites cérébraux semblent pouvoir atteindre un tel état, même si le gain n'est pas aussi élevé que pour des molécules pouvant atteindre un état singlet pur. Par exemple, pour la taurine, $T_s/T_1 \sim 2$ à 800 MHz (Ahuja et al., 2007) ce qui est déjà un gain significatif pour l'étude des temps de diffusion longs où le temps de relaxation longitudinale limite les mesures avec la séquence STEAM classique. Nous avons implémenté sur l'IRM 7 T la séquence nécessaire (SS-SQ-DOSY, single-state single-quantum diffusion ordered spectroscopy) qui amène l'opérateur de densité de certaines molécules adaptées, dont la taurine, dans un état à longue durée de vie, puis le maintient dans cet état par spin-lock durant t_d , avant de le ramener dans un état observable (Sarkar et al., 2008). Nous avons modifié la séquence en y ajoutant des gradients de localisation. Des premiers tests ont été réalisés sur un fantôme de taurine (Sigma Aldrich) avec trois temps de diffusion de ~ 194 , 485 et 1972 ms en variant l'amplitude des gradients de diffusion (de 5 à 100 mT/m à $t_d=194$ ms, de 5 à 50 mT/m à $t_d=485$ ms et de 2 à 14 mT/m à $t_d=1972$ ms) et en utilisant des gradients de diffusion d'une durée $\delta=2$ ms. Les spectres ont été acquis (TR/TE=10000/60 ms) dans un large voxel (11x15x18 mm³) avec une antenne ^1H volumique pour l'émission et une antenne ^1H surfacique pour la réception radiofréquence (Rapid Biomedical). Afin de corriger le biais introduit par les gradients d'imagerie, les spectres ont également été acquis avec des gradients de diffusion de polarité inversée. Enfin, les spectres ont été corrigés en phase et en fréquence avant d'être sommés. Le signal de la taurine a été mesuré comme l'aire sous le pic de la résonance. Les valeurs du coefficient de pondération en diffusion pour la séquence SS-SQ-DOSY ont été définies pour chaque amplitude des gradients de diffusion et temps de diffusion à l'aide de l'expression donnée par Cavadini (Cavadini et al., 2008). La figure 7.3 illustre la variation du logarithme de l'atténuation du signal en fonction de b à $t_d=1972$ ms. On remarque que le biais introduit par les termes croisés entre les gradients de diffusion et les gradients d'imagerie semble correctement corrigé en calculant la moyenne géométrique du signal acquis avec les deux polarités : le logarithme de l'atténuation du signal décroît linéairement en fonction de b . La valeur d'ADC mesurée est de $\sim 0.9 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ à $t_d=194$ ms, ~ 0.8

$\mu\text{m}^2/\text{ms}$ à $t_d=584$ ms et $\sim 1.3 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ à $t_d=1972$ ms, ce qui n'est pas constant. Néanmoins, l'ordre de grandeur cohérent aux différents temps de diffusion et la linéarité du logarithme de l'atténuation du signal en fonction de b sont encourageants. Cette séquence sera prochainement implémentée sur l'IRM 11.7 T et comparée plus en détails avec une séquence STEAM classique.

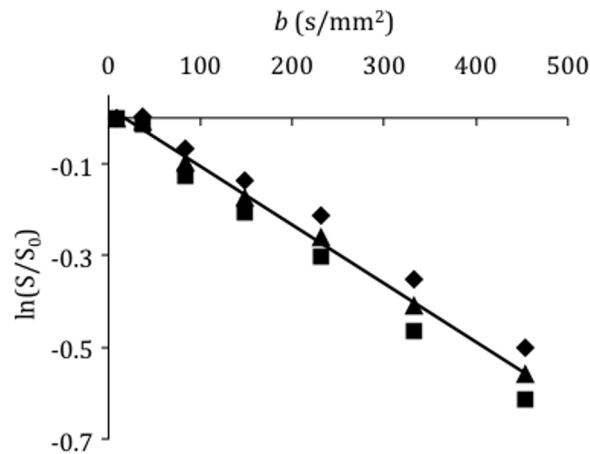


Figure 7.3 : Logarithme de l'atténuation du signal en fonction de b mesuré à $t_d=1972$ ms avec la séquence SS-SQ-DOSY (Ahuja et al., 2007) à laquelle nous avons ajouté des gradients de localisation (carré), puis avec des gradients de diffusion de polarité inversé (losange) et à partir de la moyenne géométrique du signal mesuré avec les deux polarités (triangle).

Enfin, les modèles utilisés (modèle des « neurites » et des « corps cellulaires ») dans notre étude miment la structure cellulaire de manière très simplifiée. Il est donc désormais nécessaire de développer de nouveaux modèles permettant de rendre compte de manière plus fidèle de la complexité cellulaire (ramification, nœuds, distribution de segments de fibres de longueurs différentes...). Ce travail, mené par Marco Palombo, est en cours au sein du laboratoire.

PARTIE 2

ETUDE DU METABOLISME ENERGETIQUE PAR SPECTROSCOPIE RMN DU ^{13}C ET DU ^{17}O

METABOLISME ENERGETIQUE ET SPECTROSCOPIE PAR RESONANCE MAGNETIQUE DES NOYAUX X

8.1. Introduction au métabolisme énergétique cérébral

La cellule est une industrie chimique en miniature où de nombreuses réactions se produisent. Le métabolisme regroupe l'ensemble de ces réactions biochimiques. On distingue les réactions de synthèse (anabolisme) et les réactions de dégradation (catabolisme).

Les voies cataboliques permettent de libérer de l'énergie (réaction exergonique, $\Delta G < 0$ où ΔG correspond à la variation d'enthalpie libre) au cours de la décomposition des molécules complexes en molécules plus simples. La respiration cellulaire est l'une des principales voies cataboliques. Elle permet de produire l'adénosine triphosphate ou ATP qui joue le rôle d'intermédiaire énergétique dans l'organisme. L'ATP est un nucléoside triphosphate formé d'une adénine liée à un ribosome, lui-même attaché à une chaîne de trois groupements phosphates. Les liaisons entre les groupements phosphates peuvent être facilement rompues par hydrolyse. L'hydrolyse d'une molécule d'ATP en ADP, adénosine diphosphate ($\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ADP} + \text{Pi}$ où Pi est une molécule de phosphate inorganique) permet de libérer un groupement phosphate (Pi) et de l'énergie ($\Delta G = -30.5 \text{ kJ}$). Cette énergie va être utilisée dans une voie anabolique (réaction endergonique, $\Delta G > 0$) pour phosphoryler un composé à l'aide du groupement Pi. La phosphorylation va amorcer un changement qui produit un travail : synthèse des molécules complexes à partir de précurseurs plus simples (travail chimique), transport des molécules au travers de la membrane plasmique ou des vésicules le long des microtubules et des filaments d'actine du cytoplasme en activant les moteurs protéiques, la dynéine et la kinésine (travail mécanique) ou encore maintien des potentiels membranaires (travail osmotique). L'interaction étroite entre le catabolisme et l'anabolisme s'appelle le couplage énergétique.

Le métabolisme énergétique regroupe l'ensemble des réactions permettant la production d'énergie. Il est particulièrement important dans le cerveau. En effet, celui-ci utilise 20% des réserves de glucose de l'organisme alors qu'il ne représente seulement que 2% de la masse

corporelle (Magistretti, 1999). Dans la suite, nous nous intéresserons plus particulièrement aux voies de synthèse de l'ATP au cours de la respiration aérobie dans les cellules (neurones et cellules gliales) du cerveau (figure 8.1.1).

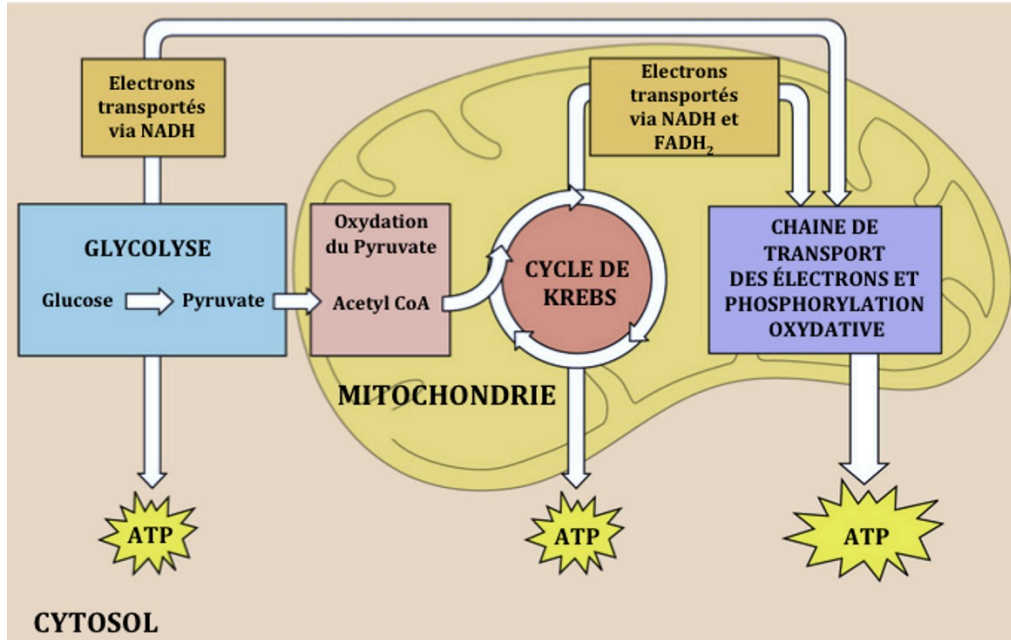
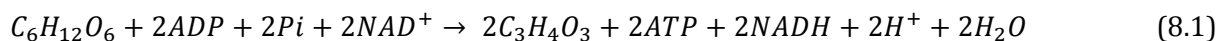


Figure 8.1.1 : Dégradation du glucose au cours de la respiration cellulaire aérobie. Figure extraite du chapitre 9 du livre de Biologie Campbell (Campbell and Reece, 2011).

8.1.1. La glycolyse

La glycolyse a lieu dans le cytosol des cellules. La dégradation d'une mole de glucose en deux moles de pyruvate se décompose en dix étapes, chacune catalysée par une enzyme spécifique. On distingue deux phases : la phase d'investissement d'énergie où de l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP est consommée (les 5 premières étapes) et la phase de libération d'énergie où on a une production d'ATP et la réduction de NAD⁺ en NADH+H⁺ (les 5 dernières étapes). Le NAD⁺, nicotinamide dinucléotide, est un coenzyme et un agent oxydant. Sa forme réduite, NADH, est produite par des déshydrogénases (enzymes) et représente une réserve d'électrons et d'énergie qui est utilisée pour la phosphorylation oxydative.

Bilan



8.1.2. Le cycle de Krebs

Oxydation du pyruvate

En présence d'oxygène, chaque mole de pyruvate entre dans la mitochondrie où elle est convertie en une mole d'acétyl-coenzyme A (acétyl-coA). Cette réaction, catalysée par un complexe multienzymatique (le complexe pyruvate déshydrogénase, PDH) dépend de cinq coenzymes dont le NAD^+ et la coenzyme A (figure 8.1.2). Chaque mole de pyruvate peut également être convertie en une mole d'oxaloacétate sous le contrôle du complexe pyruvate carboxylase (PC). Enfin, en absence d'oxygène (milieu anaérobie), le pyruvate est transformé en acide lactique via le complexe enzymatique lactate déshydrogénase. Dans la suite, nous nous limiterons aux étapes suivant la conversion du pyruvate en acétyl-coA (Rodrigues et al., 2013).

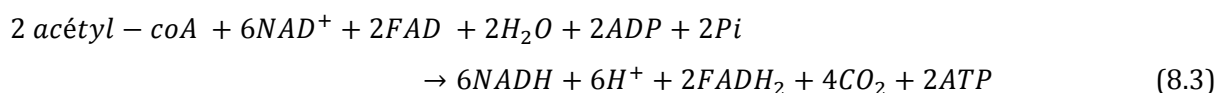
Bilan



Cycle de Krebs

Le cycle de Krebs, également connu sous le nom du cycle de l'acide tricarboxylique (TCA), comprend huit étapes, chacune catalysée par une enzyme spécifique (Krebs, 1940). La première étape, gouvernée par la citrate synthase, permet la formation d'une mole de citrate à partir d'une mole d'acétyl-coA et une mole d'oxaloacétate. Cette réaction irréversible oriente le flux du cycle de Krebs. Les étapes suivantes consistent en la dégradation du citrate en oxaloacétate qui réagira à son tour avec une nouvelle mole d'acétyl-coA pour former une nouvelle mole de citrate (figure 8.1.2). A chaque tour du TCA, une mole d'ATP est produite ainsi que trois moles de $NADH+H^+$ et $FADH_2$. Le FAD, flavine adénine dinucléotide, est un composé analogue au NAD^+ qui peut être réduit en $FADH_2$ et dont les électrons seront, à l'instar du $NADH$, utilisés au cours de la phosphorylation oxydative.

Bilan



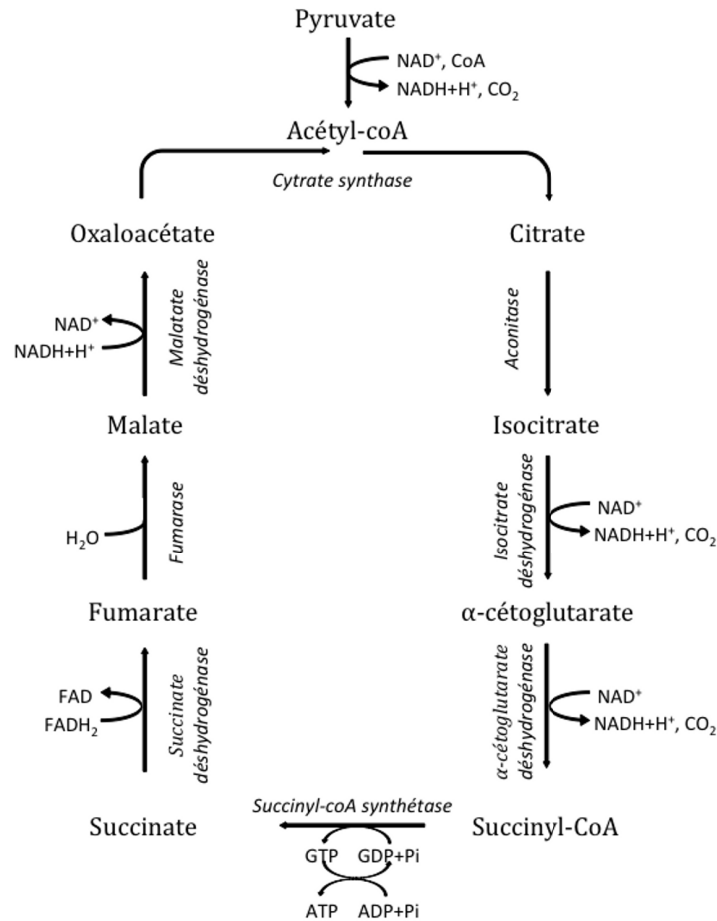


Figure 8.1.2 : Oxydation du pyruvate et les huit étapes du cycle de Krebs.

8.1.3. La phosphorylation oxydative

Au passage de la membrane mitochondriale les deux moles de $\text{NADH}+\text{H}^+$ sont converties en deux moles de FADH_2 . Les deux étapes suivantes (la chaîne de transport des électrons et la chimiosmose) vont libérer la majorité de l'énergie stockée ($\sim 90\%$) dans les transporteurs d'électrons, c.-à-d. le $\text{NADH}+\text{H}^+$ et le FADH_2 (Lodish et al., 2000).

La chaîne de transport des électrons

Les électrons du $\text{NADH}+\text{H}^+$ et le FADH_2 migrent progressivement le long d'une chaîne (composée de plusieurs complexes membranaires) conduisant ainsi à l'oxydation et la réduction successives de plusieurs molécules jusqu'à l'accepteur final : la molécule de dioxygène (figure 8.1.3). Le flux des électrons libère de l'énergie qui est utilisée pour transporter les protons H^+ de la matrice mitochondriale à l'espace intermembranaire. Le transport des électrons crée un gradient électrochimique (gradient de pH) au niveau de la membrane interne de la mitochondrie. L'énergie des électrons diminue progressivement au cours de la migration. On parle de descente énergétique. A ce stade, aucune molécule d'ATP n'est produite.

La chimiosmose

Le dernier complexe membranaire est connu sous le nom d'ATP synthase (figure 8.1.3). A l'inverse des pompes ioniques qui utilisent l'énergie stockée dans l'ATP pour transporter les ions dans le sens inverse de leur gradient, l'ATP synthase utilise le gradient électrochimique des protons de part et d'autre de la membrane interne de la mitochondrie (créé par la chaîne de transport des électrons) pour synthétiser l'ATP : force protonmotrice. On parle de chimiosmose (Mitchell, 1961). En effet, le gradient de protons induit des changements de conformation des sous-unités de l'ATP synthase qui permettent de phosphoryler l'ADP (Noji et al., 1997 ; Boyer, 1997 ; Stock et al., 1999 ; Yoshida et al., 2001).

Bilan

Le rendement de la phosphorylation oxydative peut être évalué grâce au rapport P/O , qui correspond au nombre de mole d'ATP produit par mole d'oxygène réduit. On peut également distinguer les rapports P/O_{NADH+H^+} et P/O_{FADH_2} représentant le nombre de mole d'ATP produit par mole d'oxygène réduit grâce aux transferts d'électrons provenant du $NADH+H^+$ ou du $FADH_2$. Les valeurs des rapports P/O_{NADH+H^+} et P/O_{FADH_2} ont longtemps été sujet à controverse (Hinkle and Yu, 1979 ; Beavis and Lehninger, 1986 ; Lee et al., 1996 ; Hinkle, 2005 ; Watt et al., 2010). Les valeurs de P/O_{NADH+H^+} et P/O_{FADH_2} rapportées récemment dans la littérature sont résumées dans la table 8.1.1.

	P/O_{NADH+H^+}	P/O_{FADH_2}
Hinkle, 2005	2.5	1.5
Watt et al., 2010	2.7	1.6

Table 8.1.1 : Valeurs de P/O_{NADH+H^+} et P/O_{FADH_2} rapportées dans la littérature.

8.1.4. Bilan de la respiration cellulaire

En considérant les trois grandes étapes de la dégradation du glucose, l'équation bilan de la respiration cellulaire est :



où P/O_{global} correspond au rapport du nombre de molécules d'ATP produites par la respiration cellulaire et du nombre de molécules d'oxygène réduites, soit :

$$P/O_{global} = (4 + P/O_{NADH+H^+} \times 8 + P/O_{FADH_2} \times 4) / 12 = 2.67 \quad (8.5)$$

avec $P/O_{NADH+H^+} = 2.7$ et $P/O_{FADH_2} = 1.6$ (Watt et al., 2010).

Néanmoins, le rapport P/O_{global} correspond au rendement optimal de la respiration cellulaire. En réalité, la totalité des protons H^+ n'est pas utilisée pour la production d'ATP ($P/O_{global} \leq 2.67$). Par exemple, une fraction des protons est également utilisée à d'autres fins comme le transport actif de substrat (par exemple le symport du pyruvate du cytoplasme dans la mitochondrie). Pour connaître la vraie valeur du rendement de la respiration cellulaire *in vivo*, il est nécessaire d'évaluer la vitesse des flux métaboliques et leur couplage. La spectroscopie par résonance magnétique des *noyaux X* permet d'obtenir ces informations sur le métabolisme énergétique *in vivo*.

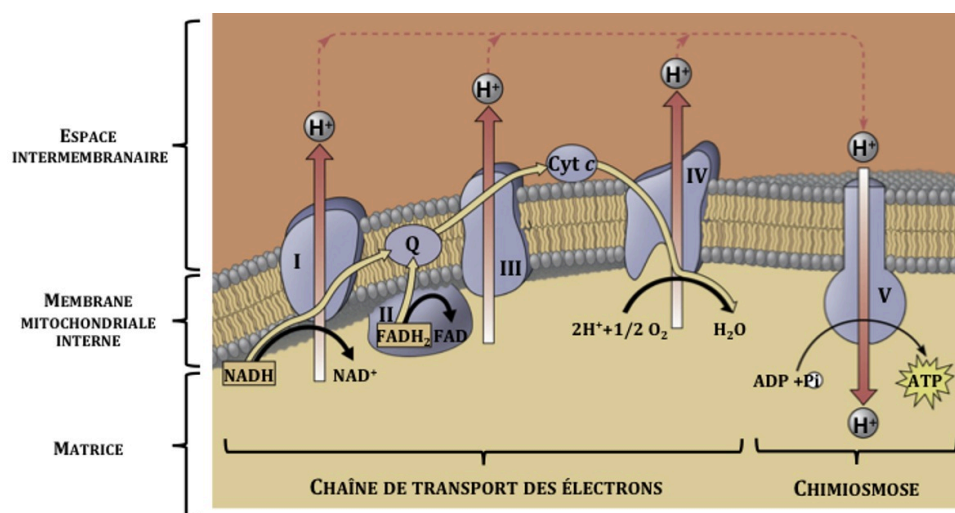


Figure 8.1.3 : Représentation du transport des électrons et la production d'ATP au cours de la phosphorylation oxydative. Ce stade permet de produire 90% des ressources en énergie de la cellule. Figure extraite du chapitre 9 du livre de Biologie Campbell (Campbell and Reece, 2011).

8.2. Spectroscopie RMN des *noyaux X* : mesure des flux métaboliques

La spectroscopie RMN permet d'étudier plusieurs noyaux autres que le 1H dits *noyaux X* : ^{13}C , ^{31}P , ^{17}O , ^{19}F ... L'étude de ces différents noyaux permet d'obtenir des informations sur les réactions biochimiques. Néanmoins, leur quantification est délicate en raison d'une faible sensibilité ($\propto \gamma^3 I(I+1)$ où γ le rapport gyromagnétique), d'une faible abondance naturelle pour certains

noyaux X et de la faible concentration des molécules étudiées (<10 mM). Ces limitations constituent des obstacles importants que les développements méthodologiques actuels tentent de minimiser (table 8.2.1).

	Spin	γ (MHz/T)	ν (MHz)	Abondance naturelle (%)	Fenêtre spectrale (ppm)
^{13}C	1/2	10.705	74.935	1.07	~250 ppm
^{17}O	5/2	-5.774	40.418	0.037	
^{31}P	1/2	17.235	120.645	100	~25 ppm
^1H	1/2	42.576	298.032	99.98	~10 ppm

Table 8.2.1 : Valeurs du spin, rapport gyromagnétique (γ), de la fréquence de résonance à 7 T, de l'abondance naturelle et fenêtre spectrale de certains noyaux *X* et du proton.

8.2.1. La spectroscopie du ^{13}C

La spectroscopie du ^{13}C est une méthode reconnue pour l'étude du métabolisme. La perfusion intraveineuse de substrats marqués au ^{13}C (par exemple le $[^{13}\text{C}]\text{-Glc}$) permet de marquer spécifiquement les différents atomes de carbone des intermédiaires métaboliques de la dégradation du glucose (de la glycolyse jusqu'au cycle de Krebs). Le marquage des différents atomes de carbone se fait progressivement à chaque tour du cycle de Krebs et dépend du marquage initial du substrat perfusé (figure 8.2.1). Néanmoins, la faible concentration de la majorité de ces intermédiaires (isocitrate, α -cétoglutarate...) les rend invisibles par RMN. Les métabolites généralement étudiés sont donc ceux en échange avec ces molécules, c.-à-d. glutamate (Glu), glutamine (Gln), aspartate (Asp), acide γ -aminobutyrique (GABA) (Henry et al., 2006).

Modélisation

L'utilisation de modèles mathématiques sophistiqués permet, à partir des dynamiques d'enrichissement, d'extraire V_{TCA} (la vitesse du cycle de Krebs), V_x (la vitesse d'échange entre α -cétoglutarate et Glu) et V_{NT} (la vitesse d'échange entre Glu et Gln). Ces modèles reposent sur les équations d'incorporation du ^{13}C aux atomes de carbone des différents métabolites. Dans la littérature, plusieurs modèles ont été développés :

- le modèle à un seul compartiment repose sur l'hypothèse que le glutamate, marqué lors de la perfusion de $[^{13}\text{C}]\text{-Glc}$, est localisé dans les neurones (Ottersen et al., 1992). Les flux mesurés reflètent alors majoritairement le métabolisme neuronal. (Mason et al., 1992 ; Mason et al., 1995 ; Henry et al., 2006).

- le modèle à deux compartiments prend en compte la compartimentation cellulaire du métabolisme dans les neurones et les astrocytes. En particulier, l'utilisation de ce modèle permet de différencier la vitesse du cycle de Krebs des neurones ($V_{TCA,N}$) et des astrocytes ($V_{TCA,G}$) (Sibson et al., 1997 ; Sibson et al., 1998 ; Gruetter al., 1998 ; Lebon et al., 2002 ; Henry et al., 2006 ; Shestov et al., 2007).
- le modèle à trois compartiments permet d'isoler le métabolisme astrocytaire, des neurones glutamatergiques et des neurones GABAergiques (Patel et al., 2005). Il est encore très peu utilisé et étudié.

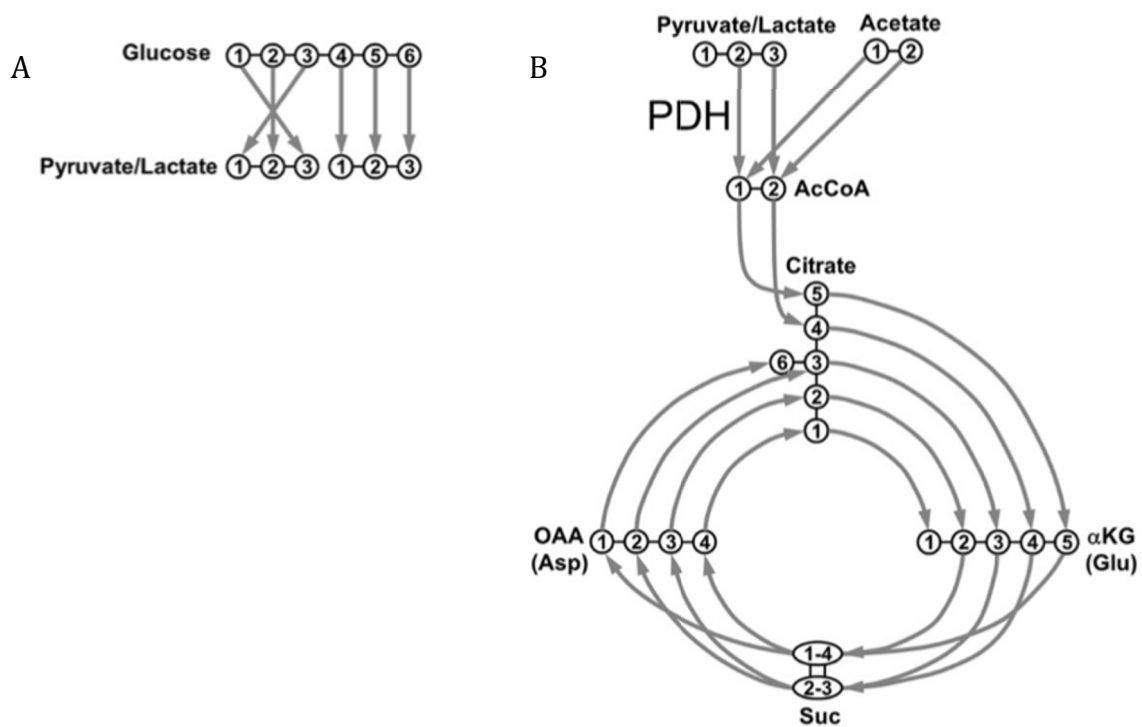


Figure 8.2.1: Représentation de l'incorporation du ^{13}C aux différents atomes de carbone lors de la glycolyse (A), du cycle de Krebs (B) et en fonction du marquage initial du glucose perfusé. On remarque que le marquage des différents atomes de carbone se fait progressivement à chaque tour du cycle de Krebs. Par exemple, la perfusion de $[1-^{13}\text{C}]\text{-Glc}$ permet de marquer spécifiquement le troisième atome de carbone (noté C3) du pyruvate, le C2 de l'acétyl-coA. Au premier tour du cycle de Krebs, le C4 du citrate et de l' α -cétooglutarate ainsi que le C2 et C3 du succinate et de l'oxaloacétate sont marqués. Au deuxième tour, le C2 et C3 du citrate et de l' α -cétooglutarate sont marqués et ainsi de suite. Figure extraite de l'article de Rodrigues et al., 2013.

Détection directe et indirecte

La détection des métabolites marqués au ^{13}C par spectroscopie RMN peut être directe ou indirecte. La première méthode consiste à acquérir des spectres pendant la perfusion de substrats marqués au ^{13}C avec une antenne dédiée accordée à la fréquence du ^{13}C (Alger et al., 1981). La résolution spectrale (~ 250 ppm) permet de séparer les différents isotopomères des métabolites, c.-à-d. les métabolites marqués simultanément à plusieurs positions atomiques. L'information, obtenue grâce à la détection d'un grand nombre d'isotopomères, renforce la modélisation mathématique et donc la détermination des différents flux métaboliques (Henry et al., 2003b). Néanmoins, la faible sensibilité du ^{13}C est une limite majeure à son utilisation. Une solution souvent choisie est alors d'utiliser la spectroscopie du ^1H pour détecter les atomes de ^{13}C couplés aux ^1H (détection indirecte). Cette méthode permet de gagner un facteur ~ 32 en sensibilité ($\propto \left(\frac{\gamma_{^1\text{H}}}{\gamma_{^{13}\text{C}}}\right)^{5/2}$) mais elle est moins spécifique (résolution spectrale de quelques ppm) et ne permet pas de quantifier les différents isotopomères. Seuls les enrichissements positionnels, c'est-à-dire la quantité totale de ^{13}C à une position atomique donnée sans tenir compte du marquage ou non d'autres positions atomiques, peuvent être mesurés (Rothman et al., 1985).

8.2.2. La spectroscopie du ^{17}O

La spectroscopie du ^{17}O permet de mesurer la vitesse de consommation de l'oxygène par le cerveau (CMRO_2). Cette technique nécessite l'inhalation de $^{17}\text{O}_2$. Une fois inhalé, le ^{17}O entre dans la circulation sanguine où il est transporté par l'hémoglobine (complexe Hb^{17}O_2 ou oxyhémoglobine) jusque dans les capillaires du cerveau. Les molécules de $^{17}\text{O}_2$ se dissocient alors de l'hémoglobine, traversent la BHE et entrent dans le tissu cérébral puis les cellules neuronales et astrocytaires. Le dioxygène marqué entre dans les mitochondries où il est métabolisé en deux molécules d'eau marquée au ^{17}O (H_2^{17}O) au cours de la phosphorylation oxydative. L'eau marquée suit alors le chemin inverse : elle sort de la mitochondrie, de la cellule, du tissu cérébral, traverse la BHE et entre dans la circulation sanguine. L'eau marquée circule dans l'ensemble du réseau artério-veineux jusqu'à son élimination (figure 8.2.2). L'oxyhémoglobine n'est pas visible en RMN à cause de son très long temps de corrélation rotationnel τ_c (10^6 fois plus long que celui de l'eau libre) qui diminue son temps de relaxation T_2 et par conséquent élargit fortement son pic de résonance. La molécule de $^{17}\text{O}_2$, présente sous forme de gaz ou dissoute dans l'eau, est fortement paramagnétique, avec un couplage dipolaire important entre les électrons et le noyau ^{17}O , et est donc également invisible par RMN. Au final, seul le signal de l'eau marquée (H_2^{17}O) peut être détecté ce qui simplifie la modélisation par

rapport aux mesures d'oxygène ^{15}O réalisées en tomographie par émission de positons où les molécules de $^{15}\text{O}_2$ liées à l'hémoglobine ou dissoutes dans le sang et les tissus et l'eau marquée au $^{15}\text{O}_2$ sont détectées (Zhu et al., 2005). Enfin, la densité de capillaires sanguins et des mitochondries n'est pas homogène dans le cerveau, et la consommation d'oxygène dans le cerveau varie d'une région à une autre (Harrison et al., 2002 ; Zhu et al., 2005). Il est donc très intéressant de ne pas mesurer la cinétique d'enrichissement et d'élimination du signal de H_2^{17}O dans un large voxel mais de construire des cartes de CMRO_2 du cerveau.

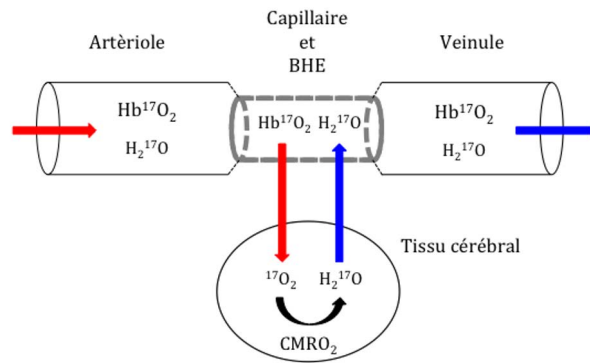


Figure 8.2.2: Schéma du modèle utilisé pour mesurer la vitesse de consommation du $^{17}\text{O}_2$ et production de H_2^{17}O lors de la phosphorylation oxydative. Seul le signal de H_2O marqué est détecté par RMN.

Détection directe et indirecte

Le signal de H_2^{17}O peut être détecté de manière directe (antenne dédiée accordée à la fréquence du ^{17}O) ou indirecte (IRM ou spectroscopie du ^1H).

Détection indirecte

La détection indirecte repose sur le couplage J entre les spins du ^{17}O et les spins du ^1H de la molécule d'eau et son impact sur le temps de relaxation transversale T_2 des deux noyaux (Meiboom, 1961 ; Kwong et al., 1991). La différence de relaxation entre les molécules de H_2^{17}O et de H_2^{16}O conduit à un temps de relaxation transversale effectif pour l'ensemble des ^1H de la forme :

$$\frac{1}{T_{2,H}} = \frac{1}{T_{2,H}^{(16)}} + f \left(\frac{1}{T_{2,H}^{(17)}} - \frac{1}{T_{2,H}^{(16)}} \right) \sim \frac{1}{T_{2,H}^{(16)}} + \frac{35}{12} f * \tau J^2 \quad (8.6)$$

où f correspond à la fraction molaire de H_2^{17}O (équivalent à la fraction d'enrichissement en ^{17}O), J est égal à la constante de couplage entre les spins du ^{17}O et les spins des protons et τ est un temps caractéristique de l'échange de protons entre les molécules de H_2^{17}O et de H_2^{16}O .

L'atténuation du signal des protons dépend alors de la quantité de $H_2^{17}O$ produite au cours de la phosphorylation oxydative et donc de la valeur de $CMRO_2$. A l'écho, on a :

$$S_{TE} = S_{t=0} \exp \left\{ -TE \left[\frac{1}{T_{2,H}^{(16)}} + \frac{35}{12} f * \tau J^2 \right] \right\} \quad (8.7)$$

Cette méthode de détection a ensuite été améliorée grâce à l'utilisation du découplage hétéronucléaire entre les noyaux 1H et ^{17}O (Ronen and Navon, 1994 ; Reddy et al., 1996 ; Ronen et al., 1997 ; Stolpen et al., 1997 ; Ronen et al., 1998). Les spectres protons sont acquis avec et sans découplage afin d'isoler le signal de $H_2^{17}O$ et quantifier la concentration absolue en eau marquée :

$$\frac{S_{TE,decouplage} - S_{TE}}{S_{TE,decouplage}} \sim \frac{35}{12} f * \tau J^2 * TE \quad (8.8)$$

$$\text{avec } S_{TE,decouplage} = S_{t=0} \exp \left\{ -TE \left[\frac{1}{T_{2,H}^{(16)}} \right] \right\}$$

Cependant, la constante de couplage entre les spins du ^{17}O et les spins des protons et la constante d'échange de protons entre les molécules $H_2^{17}O$ et $H_2^{16}O$ dépendent des paramètres physiologiques (pH et température) rendant la mesure par détection indirecte sensible et délicate pour les applications en condition pathologique (Hopkins and Barr, 1987 ; de Crespiigny et al., 2000).

Détection directe

Une autre approche consiste à détecter directement le signal de $H_2^{17}O$ par spectroscopie du ^{17}O (Fiat and Kang, 1993 ; Zhu et al., 2002 ; Zhang et al., 2004 ; Zhu et al., 2005 ; Atkinson and Thulborn, 2010 ; Hoffmann et al., 2011 ; Narazaki et al., 2013 ; Cui et al., 2013 ; Zhu et al., 2013). La concentration $H_2^{17}O$ en abondance naturelle (teneur en eau chez l'Homme : 43.3 mM dans la substance grise, 35.9 mM dans la substance blanche et 55 mM dans le liquide céphalo-rachidien, Lentner, 1981) permet de compenser la perte en sensibilité liée au faible rapport gyromagnétique et à la faible abondance naturelle du ^{17}O . Les temps de relaxation T_1 et T_2 de ce noyau sont extrêmement courts (~ 4.5 et ~ 3 ms respectivement) et sont indépendants de l'intensité du champ magnétique (Zhu et al., 2005). Il est donc possible d'augmenter de manière considérable le SNR en effectuant plusieurs répétitions à TR court. Enfin, l'utilisation des IRM à haut champ est très favorable à la détection directe ($SNR \propto (B_0)^{7/4}$, Zhu et al., 2005 ; Lu et al., 2013).

8.3. Conclusion

Le métabolisme énergétique et la synthèse d'ATP reposent sur un ensemble de réactions importantes et complexes. La spectroscopie RMN des *noyaux X* permet de mesurer les différents flux métaboliques et ainsi de caractériser l'ensemble du métabolisme énergétique : la vitesse du cycle de Krebs (V_{TCA}) avec le ^{13}C , la consommation d'oxygène au cours de la phosphorylation oxydative ($CMRO_2$) avec le ^{17}O et enfin la vitesse de synthèse de l'ATP (V_{ATP}) avec le ^{31}P (méthode que nous n'avons pas détaillée ici, Lei et al., 2003a ; Lei et al., 2003b ; Du et al., 2007 ; Du et al., 2008). La spectroscopie RMN du ^{13}C et du ^{31}P ont été mises en œuvre au sein de l'équipe sur l'IRM 3 T du Service Hospitalier Frédéric Joliot (SHFJ) à Orsay (travaux de thèse de Fawzi Boumezbeur, Julien Valette et Myriam Chaumeil). Ces deux techniques ont permis de mesurer V_{TCA} et V_{ATP} et d'évaluer le rendement énergétique dans un large voxel dans le cerveau du macaque (Boumezbeur et al., 2004 ; Chaumeil et al., 2009). Au cours de cette thèse, des développements ont été réalisés pour mettre en œuvre la spectroscopie RMN du ^{13}C et du ^{17}O sur l'IRM 7 T (Agilent, Palo Alto, CA, USA) de MIRCen afin d'améliorer la sensibilité de détection, et la résolution spatiale et d'obtenir de nouvelles informations biochimiques (mesure de $CMRO_2$ par spectroscopie du ^{17}O). L'objectif à plus long terme est d'utiliser ces deux techniques pour mesurer les atteintes du métabolisme *in vivo* dans un modèle macaque de la maladie de Huntington développé au laboratoire. En effet, dans le contexte des maladies neurodégénératives, la spectroscopie RMN des *noyaux X* présente un potentiel unique, en particulier dans la maladie de Huntington où l'équilibre des différentes réactions est perturbé (pour revue, voir Brouillet et al., 1999).

MISE EN ŒUVRE DE LA SPECTROSCOPIE DU ^{13}C A 7 T

La spectroscopie du ^{13}C permet d'étudier les flux métaboliques impliqués dans la dégradation du glucose dans le cerveau. La mesure de la vitesse du cycle de Krebs V_{TCA} par spectroscopie du ^{13}C en détection indirecte sur des modèles macaques sains et atteints de la maladie de Huntington (modèle 3-NP, acide 3-nitropropionique, Brouillet et al., 1999) a été validée au laboratoire sur l'IRM 3 T du Service Hospitalier Frédéric Joliot à Orsay (travaux de thèse de Fawzi Boumezbeur). Une diminution significative de V_{TCA} ($\sim 40\%$), liée à l'inhibition de l'enzyme succinate déshydrogénase (responsable de la conversion du succinate en fumarate) par le 3-NP, a été observée. Dans cette étude, nous avons voulu profiter du gain en sensibilité à haut champ magnétique pour développer la spectroscopie du ^{13}C sur l'IRM 7 T (Agilent, Palo Alto, CA, USA) de MIRCen. Une première approche de détection indirecte a été implémentée. Les limitations rencontrées nous ont ensuite motivés à développer une méthode de détection directe.

9.1. Spectroscopie du ^{13}C en détection indirecte

Comme nous l'avons indiqué au chapitre précédent, la détection du marquage des atomes de carbone au ^{13}C (le seul isotope du carbone visible par RMN) est possible grâce à l'acquisition de spectres ^1H (détection indirecte). Quatre cinétiques d'enrichissement sont généralement étudiées : $[4\text{-}^{13}\text{C}]\text{-Glu}$, $[3\text{-}^{13}\text{C}]\text{-Glu}$, $[4\text{-}^{13}\text{C}]\text{-Gln}$, $[3\text{-}^{13}\text{C}]\text{-Gln}$ correspondants au marquage du glutamate (Glu) et de la glutamine (Gln) au cours du premier et deuxième tour du cycle de Krebs. Dans la littérature, différentes approches méthodologiques ont été développées pour leur détection :

- utilisation de la séquence d'édition POCE (Proton Observed Carbon Edited) pour détecter spécifiquement les ^1H couplés à des ^{13}C (la contribution dominante des ^1H non couplés, c'est-à-dire engagés dans une liaison électronique avec des carbones ^{12}C , est éliminée en introduisant un pulse d'inversion ^{13}C tous les deux scans (Fitzpatrick et al., 1990 ; Henry et al., 2006).
- utilisation d'une simple séquence de spectroscopie localisée pour visualiser la disparition progressive des atomes de carbone ^{12}C (raies mères) et l'apparition des atomes de carbone ^{13}C (raies satellites) (Boumezbeur et al., 2004). Néanmoins, cette méthode, basée sur la

soustraction de spectres acquis pendant la perfusion intraveineuse de glucose marqué à un spectre acquis avant le début de la perfusion, et l'analyse de ces spectres de différence, est très sensible aux variations de phase, de shim ou de fréquence introduites pendant la perfusion. Cependant, elle présente deux avantages considérables : aucun canal radiofréquence ^{13}C n'est nécessaire (ce qui simplifie énormément le setup expérimental), et il ne faut pas découpler pendant l'acquisition pour supprimer le couplage entre les atomes des ^1H et ^{13}C (ce qui limite les problèmes de dépôt d'énergie et d'échauffement excessifs). C'est la méthode que nous avons choisie pour notre étude.

9.1.1. Protocole expérimental

Préparation et suivi de l'animal

Nous avons réalisé une expérience sur un macaque à jeun (*macaca fascicularis*, poids 7.2 kg). Le protocole d'anesthésie, de positionnement, de ventilation et du suivi des constantes physiologiques de l'animal est identique à celui présenté au chapitre 3. Les constantes physiologiques sont restées stables au cours de l'expérience : pressions systolique/diastolique $71\pm 3/29\pm 6$ mmHg, fréquence respiratoire 18 min^{-1} , pression CO_2 expiré 36 ± 1 mmHg.

Protocole de perfusion intraveineuse du [U- ^{13}C]-Glucose

Les veines fémorales droite et gauche sont canulées pour faciliter la perfusion de l'anesthésiant, du glucose uniformément marqué ([U- ^{13}C]-Glc) et le prélèvement d'échantillons sanguins. Dans un premier temps, la concentration de glucose plasmatique est triplée à l'aide d'un bolus de [U- ^{13}C]-Glc (enrichi à 99%) pendant 3 minutes (débit 3.86 mL/min , 20% en volume). Ensuite, la glycémie et l'enrichissement plasmatique sont maintenus par une perfusion continue d'un mélange de [U- ^{13}C]-Glc (débit 0.18 mL/min^{-1} , 20% en volume) et de glucose non marqué (débit 0.36 mL/min^{-1} , 5% en volume). La glycémie plasmatique est mesurée à l'aide d'un glycomètre One Touch (Lifescan Inc., Milpitas, CA, USA) toutes les 5 minutes pendant le premier quart d'heure puis toutes les 10 minutes afin de vérifier que la glycémie reste stable et le cas échéant ajuster le débit de glucose (glycémie initiale : 0.8 g/L , glycémie pendant l'expérience : $2.0\pm 0.2\text{ g/L}$).

Acquisition des données

Les spectres ^1H ont été acquis avec l'IRM 7 T Agilent de MIRCen (Palo Alto, CA, USA) une antenne ^1H de surface (RapidBiomed) et une séquence LASER (Localization by Adiabatic SElective Refocusing, Garwood and DelaBarre, 2001) dans un large voxel ($18\times 18\times 18\text{ mm}^3$) positionné dans le lobe fronto-pariétal (figure 9.1.1) avec les paramètres suivants :

- TR/TE : 2000/30.5 ms, largeur spectrale : 4000 Hz
- 512 scans pour le premier spectre (référence avant le bolus de glucose), puis 64 scans pour les spectres acquis au cours de la perfusion de $[\text{U-}^{13}\text{C}]\text{-Glc}$
- suppression du signal de l'eau à l'aide d'un module VAPOR

Les spectres ont été acquis pendant une durée totale de 2 heures avec une résolution temporelle de 2 minutes. Des spectres sans suppression du signal de l'eau ont également été acquis toutes les 30 minutes pour vérifier la stabilité du shim et corriger le léger décalage de la fréquence de résonance ($\text{shim}=14.2\pm 1$ Hz).

Traitement des données

Cinétiques d'enrichissement

Le traitement des données a été réalisé sur Matlab (The Mathworks, Natick, MA, USA). Les spectres ont été corrigés en phase et en fréquence. Nous avons ensuite soustrait chaque spectre acquis au cours de la perfusion de $[\text{U-}^{13}\text{C}]\text{-Glc}$ au spectre de référence (figure 9.1.1) afin de visualiser la diminution des raies mères et l'augmentation des raies satellites. Les spectres de différence ont enfin été analysés avec LCModel (Provencher, 1993). La base LCModel, générée sous Matlab à partir du calcul de l'évolution de l'opérateur densité (paramétré en fonction de l'Hamiltonien du système de spins considéré, Boumezbeur et al., 2004 ; Henry et al., 2006) inclut : le glutamate marqué à la position C3 et C4 ainsi que la glutamine marquée également à la position C3 et C4 ($[\text{4-C}]\text{-Glu}$, $[\text{3-C}]\text{-Glu}$, $[\text{4-C}]\text{-Gln}$, $[\text{3-C}]\text{-Gln}$). Néanmoins, l'absence de signal correspondant au $[\text{4-C}]\text{-Gln}$ à 2.45 ppm sur le spectre après 2 heures de perfusion de glucose marqué suggère que sa contribution est très faible (figure 9.1.2). Pour limiter la variabilité de notre ajustement, nous avons donc utilisé une base plus restreinte constituée uniquement du $[\text{4-C}]\text{-Glu}$ et $[\text{3-C}]\text{-Glu}$ (le marquage du glutamate précédant celui de la glutamine).

Modélisation des données

Nous avons utilisé un modèle à un seul compartiment et une régression non linéaire des moindres carrés afin d'extraire la valeur de V_{TCA} des cinétiques d'enrichissement du glutamate C3 et C4. Ce modèle métabolique décrit l'incorporation du ^{13}C du glucose plasmatique jusqu'au glutamate (Mason et al., 1992 ; Boumezbeur et al., 2004 ; Chaumeil et al., 2009). L'erreur sur l'ajustement des données a été estimée à l'aide d'une analyse de Monte Carlo (identique à celle effectuée pour les données de spectroscopie du ^1H pondérée en diffusion, chapitre 5).

9.1.2. Résultats

Qualité des spectres

La figure 9.1.1 illustre la qualité des spectres obtenus. Le gain considérable en sensibilité obtenu à 7 T et l'utilisation d'une séquence LASER nous permet de mesurer V_{TCA} en une seule session d'imagerie. En comparaison, une mesure précise de V_{TCA} à 3 T nécessitait de moyenner les cinétiques d'enrichissement de 8 sessions d'imagerie (Chaumeil et al., 2009).

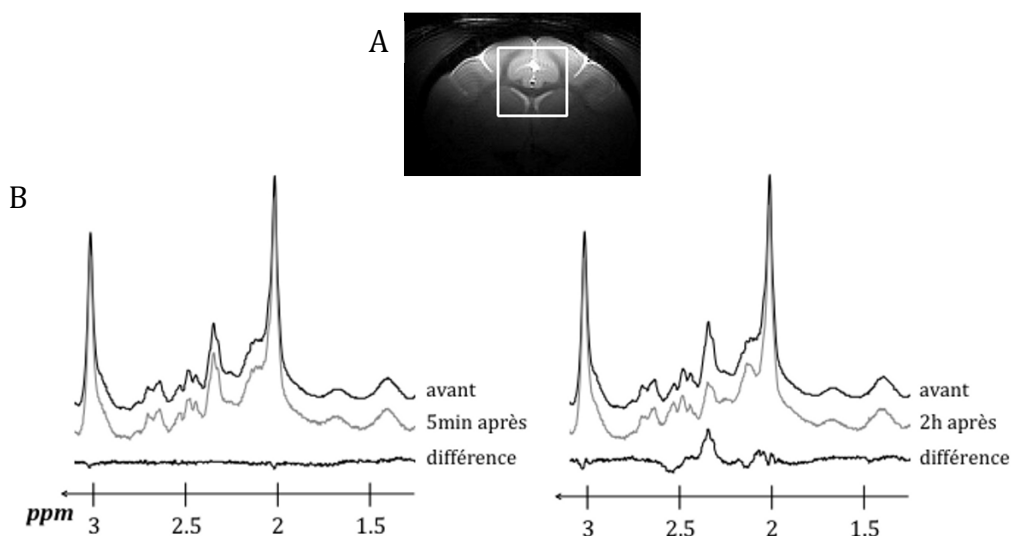


Figure 9.1.1: (A) Positionnement du voxel ($18 \times 18 \times 18 \text{ mm}^3$) dans le lobe fronto-pariétal du macaque. (B) Spectres acquis avant, 5 min après et 2 heures après le début de la perfusion intraveineuse de $[U-^{13}\text{C}]\text{-Glc}$ et les spectres de différence.

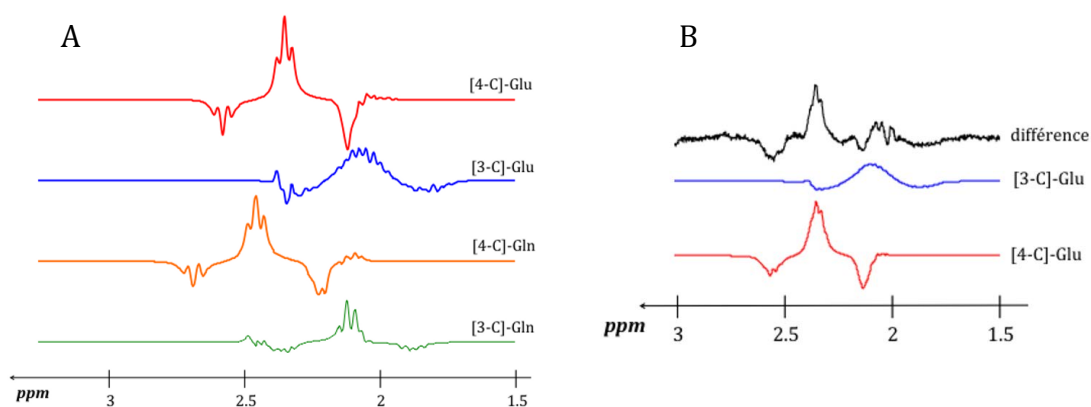


Figure 9.1.2: (A) Simulation des spectres de différence du $[4\text{-C}]\text{-Glu}$ (rouge), $[3\text{-C}]\text{-Glu}$ (bleu), $[4\text{-C}]\text{-Gln}$ (orange) et $[3\text{-C}]\text{-Gln}$ (vert) à partir de l'évolution de l'opérateur de densité. (B) Spectre de différence (2h après le début de la perfusion de $[U-^{13}\text{C}]\text{-Glc}$) et décomposition LCMModel ($[4\text{-C}]\text{-Glu}$ en rouge et $[3\text{-C}]\text{-Glu}$ en bleu).

Cinétiques d'enrichissement et quantification de V_{TCA}

Les cinétiques d'enrichissement expérimentales et leurs meilleurs ajustements (calculés à partir du modèle à un seul compartiment et de la valeur de V_{TCA} déterminée) sont présentées sur la figure 9.1.3. La qualité des spectres nous a permis d'avoir une résolution temporelle de 2 min. Il s'agit d'un gain considérable en comparaison aux études précédentes à 3 T où la résolution temporelle était de 10 min et où le signal acquis au cours de plusieurs sessions d'imagerie était moyenné (Chaumeil et al., 2009). On peut remarquer que l'enrichissement du [3- ^{13}C]-Glu est plus faible que celui du [4- ^{13}C]-Glu. Ceci est cohérent avec le marquage du glutamate en position C4 au premier tour et le marquage du glutamate en position C3 au deuxième tour du cycle de Krebs. L'analyse de Monte Carlo nous donne : $V_{TCA}=0.43\pm0.02$ $\mu\text{mol/g}$ de tissu cérébral/min (calculé en considérant que la densité de tissu cérébral est de 1 g/mL, Barber et al., 1970 ; DiResta et al., 1990 ; Chaumeil et al., 2009). Nous pouvons observer que l'ajustement de la cinétique du [3- ^{13}C]-Glu n'est pas très bon, biaisant très certainement la valeur de V_{TCA} .

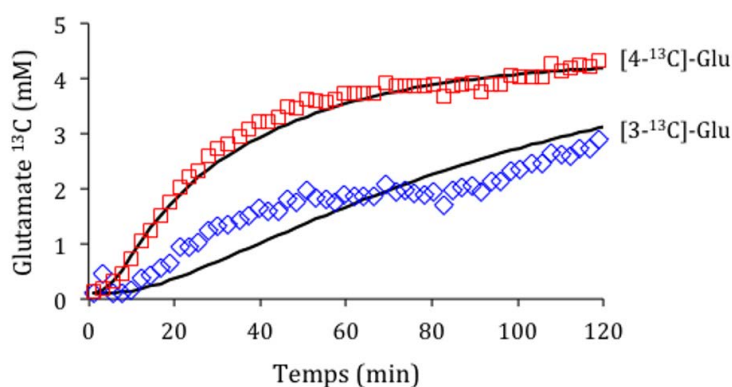


Figure 9.1.3: Cinétiques d'enrichissement en ^{13}C du [3- ^{13}C]-Glu (bleu) et [4- ^{13}C]-Glu (rouge) pendant la perfusion de [U- ^{13}C]-Glc et ajustement des données avec le modèle à un seul compartiment (ligne noire).

9.1.3. Discussion

Les données acquises dans un large voxel dans le cerveau d'un macaque et l'utilisation d'un modèle à un seul compartiment, nous ont permis de mesurer la vitesse du cycle de Krebs ($V_{TCA}=0.43\pm0.02$ $\mu\text{mol/g}$ de tissu cérébral/min). La valeur obtenue est très différente des valeurs de la littérature où $V_{TCA}=0.55\pm0.04$ $\mu\text{mol/g}$ de tissu cérébral/min dans le striatum (voxel de 3.9 mL, résolution temporelle de 9 min, moyenne sur 4 sessions d'imagerie, Boumezbeur et al., 2004) et $V_{TCA}=0.63\pm0.12$ $\mu\text{mol/g}$ de tissu cérébral/min dans un large voxel très proche de celui utilisé dans notre étude (8 mL, résolution temporelle de 10 min, moyenne sur 8 sessions d'imagerie, Chaumeil et al., 2009). Cet écart peut être attribué au biais dans l'ajustement des

données (figure 9.1.3) induit par la deuxième augmentation de la cinétique d'enrichissement du [3-C]-Glu après une heure de perfusion de glucose marqué. Dans notre étude, la qualité des données (grande résolution temporelle et bruit faible) suggère fortement que le biais introduit vient de la modélisation des données ou de la décomposition spectrale. Dans les études précédentes conduites à 3 T, la même stratégie méthodologique avait été choisie : seuls les spectres théoriques du [4-C]-Glu et [3-C]-Glu avaient été utilisés pour ajuster les données expérimentales et obtenir les cinétiques d'enrichissement (le marquage de la glutamine avait également été négligé). La résolution temporelle et le SNR obtenus dans ces études étaient significativement plus faibles que pour notre étude. Il est donc possible que cette qualité moindre des données ne permettait pas de distinguer cette deuxième augmentation dans l'enrichissement du [3-C]-Glu au-delà d'une heure de perfusion de glucose marqué. Il faut aussi noter qu'à 7 T, la position des satellites ^{13}C n'est pas optimale. En effet, on peut remarquer sur la figure 9.1.2 que les raies mères et satellites du [3-C]-Glu et [3-C]-Gln sont partiellement superposées. Le marquage du [4-C]-Gln et [3-C]-Gln plus tardif (lié à l'échange entre le glutamate et la glutamine, Sibson et al., 1997 ; Lebon et al., 2002) contamine potentiellement l'enrichissement au-delà de 80 minutes de perfusion. Pour tester cette hypothèse, nous avons à nouveau ajusté nos données expérimentales mais en utilisant seulement les 40 premières minutes d'acquisition (figure 9.1.4). La valeur de V_{TCA} mesurée ($V_{TCA}=0.62\pm0.04$ $\mu\text{mol/g}$ de tissu cérébral/min) et le meilleur ajustement des données semble confirmer cette hypothèse. Nos résultats suggèrent donc que la stratégie méthodologique utilisée permet de mesurer la vitesse du cycle de Krebs de manière relativement précise lorsque des temps de perfusion courts sont utilisés (pour ne pas être sensible au marquage de la glutamine). Cependant, les cinétiques d'enrichissement restent incomplètes, ce qui pourrait potentiellement biaiser la modélisation et n'est pas très satisfaisant. Une méthode de détection directe pourrait donc être plus adaptée.

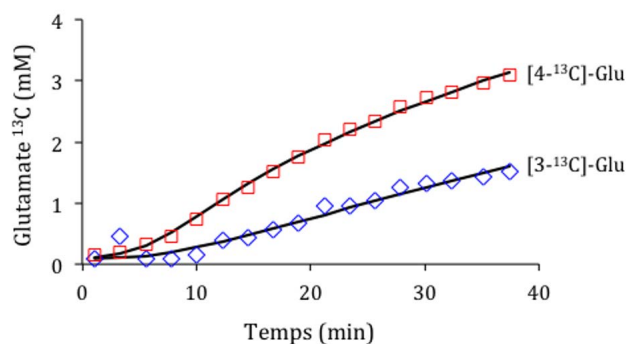


Figure 9.1.4: Cinétiques d'enrichissement en ^{13}C du [3-C]-Glu (bleu) et [4-C]-Glu (rouge) pendant les 40 premières minutes de perfusion de $[U-^{13}\text{C}]\text{-Glc}$. et ajustement des données avec le modèle à un seul compartiment (ligne noire).

9.2. Spectroscopie du ^{13}C en détection directe

La très bonne résolution spectrale de la spectroscopie du ^{13}C en détection directe (~ 250 ppm) permet en théorie de construire les cinétiques d'enrichissement en ^{13}C des différents atomes de carbone (C2, C3 et C4) du NAA, GABA, glutamate, glutamine, myo-inositol, aspartate mais également de différencier les résonances simples et multiples (marquage simultané ou non de plusieurs atomes de carbone), c'est-à-dire de quantifier les isotopomères (Henry et al., 2003a). Cependant, la faible sensibilité de détection intrinsèque du ^{13}C limite son utilisation à faible champ magnétique. Avec la collaboration de Pierre-Gilles Henry et Dinesh Deelchand de l'université du Minnesota, nous avons implémenté la séquence 3D ISIS-DEPT (figure 9.2.1) sur l'IRM 7 T Agilent de MIRCen (Henry et al., 2003b).

9.2.1. La séquence 3D ISIS-DEPT

La localisation ^1H est réalisée par un module 3D ISIS (Image-Selected *in vivo* Spectroscopy) complété d'un module OVS de suppression du volume extérieur. L'aimantation est ensuite transférée aux atomes de carbone à l'aide d'une séquence DEPT de transfert de polarisation (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer). Cette séquence, illustrée à la figure 9.2.1, permet une large détection spectrale localisée avec un artéfact de déplacement chimique minimal.

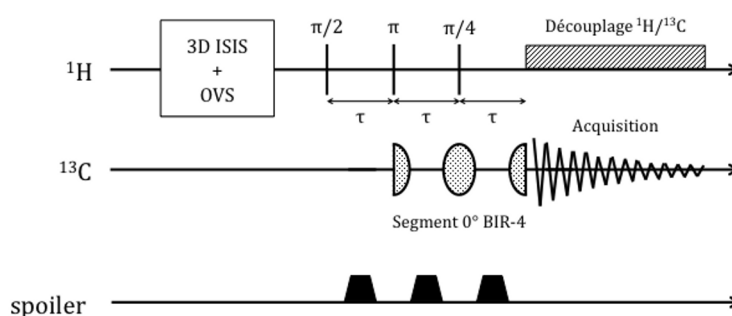


Figure 9.2.1: Schéma de la séquence 3D ISIS-DEPT développée par Pierre-Gilles Henry et Dinesh Deelchand à l'université du Minnesota (Henry et al., 2003b).

Module 3D ISIS

La séquence 3D ISIS permet d'isoler le signal d'un voxel d'intérêt. Pour cela, 8 répétitions sont nécessaires au cours desquelles plusieurs impulsions d'inversion et des gradients de sélection de coupe sont appliqués. A chaque répétition, le nombre d'impulsion d'inversion est différent. Pour un nombre pair d'impulsion, l'aimantation à l'intersection des coupes est alignée selon B_0

tandis que pour un nombre impair d'impulsion, l'aimantation à l'intersection des coupes est alignée selon $-B_0$. Enfin, un cyclage de phase à la réception est ajouté afin d'additionner de manière cohérente le signal intérieur au voxel d'intérêt et de supprimer le signal extérieur (Ordidge et al., 1986). Outre l'absence de relaxation T_2 , l'intérêt de cette séquence pour la localisation avant le transfert de polarisation est que la localisation se fait sans évolution sous l'effet des couplages J.

Module DEPT

La localisation est critique en détection directe où la large gamme de déplacement chimique (~ 250 ppm) peut conduire à des erreurs de localisation importante. Le transfert de polarisation permet d'exciter un noyau et d'en observer un autre. L'avantage est donc de pouvoir localiser le signal en ^1H et ensuite transférer la polarisation au ^{13}C . Cela permet de réduire les artéfacts de déplacement chimique. De plus, on bénéficie aussi d'un gain important en sensibilité ($\propto \left(\frac{\gamma_{^1\text{H}}}{\gamma_{^{13}\text{C}}}\right) \sim 4$) (Bendall et al., 1985). Parmi les séquences classiques de transfert de polarisation, on peut relever la séquence INEPT (Insensitive Nucleus Enhancement by Polarization Transfer, Morris and Freeman, 1979), la séquence DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer, Doddrell et al., 1982) et la séquence de polarisation croisée (Artemov et al., 1995 ; van den Bergh et al., 1998). Notons que l'utilisation de la séquence INEPT classique conduit à des distorsions des pics (multiplets non refocalisés) que la séquence DEPT permet de corriger.

Notons que dans cette séquence les impulsions $\pi/2$ et π de la partie ^{13}C du module DEPT classique sont remplacées par un pulse BIR-4 (B_1 insensitive rotation). Le pulse BIR-4 est composé de quatre segments. Chaque segment correspond à la moitié d'un pulse adiabatique d'inversion non sélectif (Adiabatic Half Passage). Il permet de rendre le module ^{13}C insensible aux inhomogénéités de champ B_1 (de Graaf et al., 1995 ; Tannus and Garwood, 1997 ; Garwood and DelaBarre, 2001).

Découplage hétéronucléaire

Enfin, l'utilisation d'un module de découplage « large bande » au moment de l'acquisition permet de supprimer le couplage hétéronucléaire (c.-à-d. annuler le dernier terme de l'expression 9.1) et ainsi de séparer les différentes résonances sur le spectre ^{13}C . Le principe consiste à appliquer plusieurs impulsions π afin de refocaliser les déphasages induits par le couplage hétéronucléaire. Néanmoins, un tel schéma induit un dépôt de puissance important. Il peut être remplacé par une série de pulses composites (Levitt and Freeman, 1981) :

- schéma GARP : premier pulse composite constitué d'une série de pulses avec des angles de basculement différents
- schéma MLEV-16 : 16 répétitions du bloc $(\pi/2)_x - (\pi)_y - (\pi/2)_x$ (Levitt et al., 1982)
- schéma WALTZ-16 : 16 répétitions du bloc $(\pi/2)_x - (\pi)_y - (3\pi/2)_x$ (Shaka et al., 1983a ; Shaka et al., 1983b)

9.2.2. Validation de la séquence *in vitro*

La séquence a été validée à l'aide d'un fantôme de glucose marqué au ^{13}C à la position C1 (concentration $[1\text{-}^{13}\text{C}]\text{-Glc} \sim 154 \text{ mM}$). La solution de glucose utilisée contient les deux stéréoisomères de la molécule de glucose (α -glucose et β -glucose). La différence de déplacement chimique (liée à la différence de position du groupe $-\text{OH}$ sur le premier carbone) permet de différencier la position C1 des deux stéréoisomères sur un spectre ^{13}C . Sans découplage hétéronucléaire, chaque pic apparaît sous la forme d'un doublet. Nous avons utilisé une antenne simple boucle de surface pour l'émission et la détection ^1H et une antenne quadrature de surface pour l'émission et la détection ^{13}C (RapidBiomed). Les spectres ont été acquis dans un large voxel ($30 \times 30 \times 30 \text{ mm}^3$) positionné au plus près de l'antenne ^{13}C .

Dans un premier temps, nous avons vérifié les capacités de découplage de notre système à l'aide d'une séquence « Single Pulse » classique. Nous avons utilisé une impulsion $\pi/2$ carrée (« hard » pulse) d'une durée de $160 \mu\text{s}$ et une puissance de 50 dB. Nous avons acquis des spectres (8 répétitions, $\text{TR}=2 \text{ s}$) avec et sans découplage. Nous avons comparé la performance d'un découplage WALTZ-16 vis à vis d'un découplage GARP. La figure 9.2.3 illustre les différences de découplage. Sans découplage, le spectre présente quatre pics correspondant aux deux doublets du α -glucose et β -glucose marqués à la position C1. Avec découplage, on observe le pic de la résonance C1 du α -glucose à 92.7 ppm et le pic de la résonance C1 du β -glucose à 96.6 ppm. Le découplage WALTZ-16 est de meilleure qualité que le GARP et permet d'augmenter le SNR d'un facteur ~ 1.4 .

Ensuite, nous avons testé la séquence 3D ISIS-DEPT. Pour la localisation 3D-ISIS, nous avons utilisé des impulsions sécantes hyperboliques (ordre $n=4$, produit bande passante \times durée du pulse $R=20$) d'une durée de $4000 \mu\text{s}$ et d'une puissance de 58 dB. Pour les impulsions de la partie ^1H du module DEPT, des impulsions carrées avec une puissance de 53 dB et une durée de 250 (impulsion $\pi/2$), 500 (impulsion π) et $125 \mu\text{s}$ (impulsion $\pi/4$) ont été choisies. Pour les calibrer, nous avons utilisé une séquence STEAM ($\text{TR}/\text{TE}/\text{TM}=5000/8.5/6.5 \text{ ms}$). Enfin, les impulsions de la partie ^{13}C du module DEPT (puissance de 55 dB et durée de $350 \mu\text{s}$) ont été

calibrées à l'aide d'une séquence « Single Pulse ». Un spectre (8 répétitions, $\text{TR}=2.5$ s) acquis en 22 s avec un module de découplage WALTZ-16 (puissance 50 dB, largeur de découplage 500 Hz, fréquence de modulation 1000 Hz) est rapporté à la figure 9.2.3.

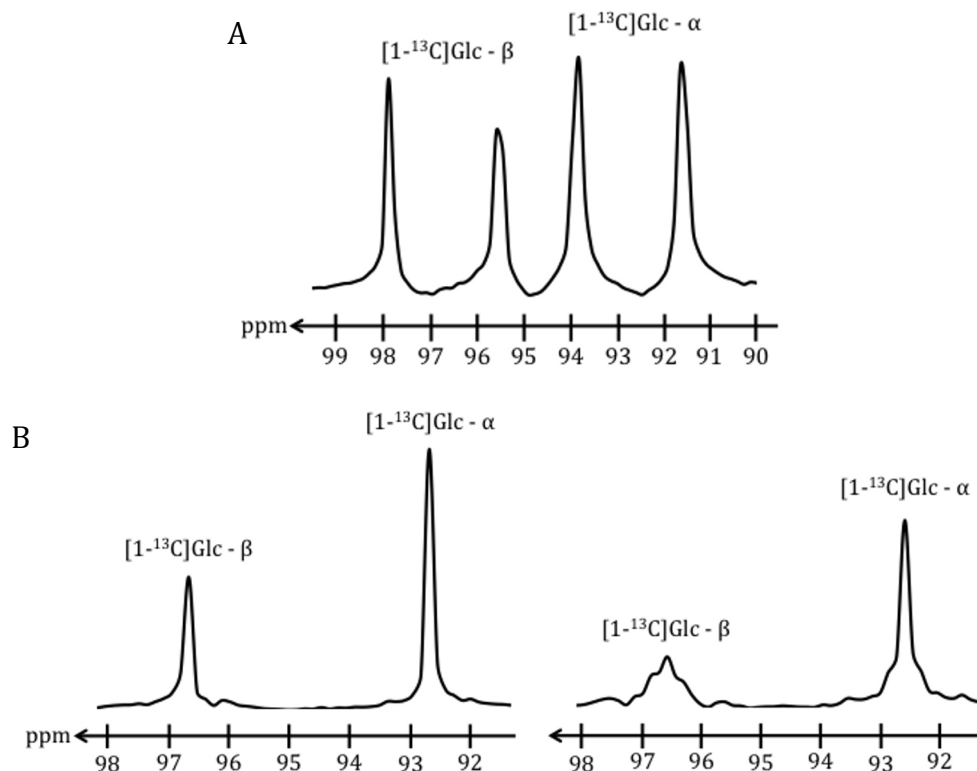


Figure 9.2.2: (A) Spectre acquis en détection directe du ^{13}C avec une séquence « Single Pulse » sans découplage. (B) Spectre acquis avec la même séquence mais avec un module de découplage WALTZ-16 (gauche) et GARP (droite). L'échelle de l'axe des ordonnées est la même pour les deux spectres illustrant ainsi le gain en sensibilité avec le module WALTZ-16.

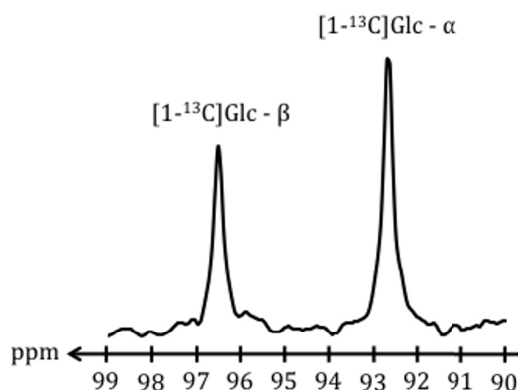


Figure 9.2.3 : Spectre acquis dans un large voxel ($30 \times 30 \times 30 \text{ mm}^3$) avec la séquence 3D ISIS-DEPT optimisée ($l_b=8$ Hz).

9.2.3. Limitations rencontrées *in vivo*

Après avoir validé notre séquence *in vitro*, nous avons effectué un test *in vivo* sur un macaque (*macaca fascicularis*, poids 5.1 kg). Le protocole de préparation, suivi de l'animal et de perfusion de $[\text{U-}^{13}\text{C}]\text{-Glc}$ est identique à celui détaillé pour l'expérience en détection indirecte. Cependant, l'expérience a dû être arrêtée très rapidement : l'acquisition répétée de spectres avec le module de découplage hétéronucléaire WALTZ-16 a conduit à un dépôt de puissance trop important et l'apparition d'un arc électrique. Pour des raisons éthiques, il nous a semblé impossible de continuer à explorer cette approche chez le macaque.

9.3. Conclusion

La spectroscopie du ^{13}C est une méthode très reconnue pour étudier le métabolisme énergétique *in vivo*. En détection indirecte, la stratégie méthodologique et le protocole expérimental utilisés ne permettent pas de conclure sur la capacité de mesurer de manière robuste la valeur de V_{TCA} à 7 T par spectroscopie du ^{13}C . En détection directe, le dépôt de puissance important lors du découplage hétéronucléaire ne nous a pas permis de poursuivre les expériences *in vivo*. Ces deux limitations nous ont donc poussés à développer une solution alternative qui sera abordée dans le chapitre suivant : la spectroscopie du ^{17}O .

DEVELOPPEMENT DE LA SPECTROSCOPIE DU ^{17}O A 7 T

Dans la littérature, la spectroscopie RMN du ^{17}O en détection directe a été utilisée pour mesurer la vitesse de consommation cérébrale d'oxygène (CMRO_2) chez le rat (Zhu et al., 2002 ; Zhang et al., 2004 ; Zhu et al., 2005 ; Lu et al., 2013), la souris (Narazaki et al., 2013 ; Cui et al., 2013 ; Zhu et al., 2013), le chat (Pekar et al., 1991) et l'Homme (Zhu et al., 2005 ; Atkinson and Thulborn, 2010 ; Hoffmann et al., 2011). Cette étude est donc la première à s'intéresser à la mesure de CMRO_2 chez le macaque. Plusieurs développements ont été nécessaires : (i) mise en place d'un circuit respiratoire pour l'inhalation de $^{17}\text{O}_2$, (ii) implémentation et adaptation des modèles analytiques proposés dans la littérature pour extraire la valeur de CMRO_2 et (iii) acquisition de spectres ^{17}O *in vivo*.

10.1. Développements matériels et méthodologiques

10.1.1. Système de ventilation

Pour mesurer la valeur de CMRO_2 *in vivo*, le signal doit être enregistré avant, pendant et après l'inhalation de $^{17}\text{O}_2$. C'est pourquoi, un système de ventilation respiratoire sur mesure et compatible IRM a été construit (figure 10.1.1). La sonde d'intubation de l'animal est connectée à un robinet 3 voies (VacuMed, CA, USA) permettant de basculer rapidement d'un mélange air+oxygène au $^{17}\text{O}_2$. Le $^{17}\text{O}_2$ (enrichi à 70%, NUKEM Isotopes GmbH, Allemagne) est placé dans un circuit fermé. Le coût du gaz $^{17}\text{O}_2$ (~16000 euros pour 5 L) a demandé d'optimiser le circuit afin de limiter les pertes (volume~1350 mL) et maximiser le temps d'inhalation (~10 minutes).

Le circuit que nous avons conçu comprend deux valves unidirectionnelles pour orienter le flux du gaz, un ballon en silicone de 1 L, deux tubes en silicone (longueur : 110 cm, diamètre interne : 9.5 mm), des raccords permettant de connecter l'ensemble des éléments (Teleflex, France), un absorbeur CO_2 pour maximiser le temps d'inhalation. L'ensemble du circuit est fixé à un cadre (usiné par la société m2e Unimécanique, France), lui-même attaché au cadre stéréotaxique existant sur lequel est positionné l'animal, afin d'actionner le robinet 3 voies au cours de l'expérience depuis l'extérieur de l'aimant (figure 10.1.1). La longueur des tubulures

permet de placer le ballon à l'extérieur de l'aimant afin de ventiler l'animal manuellement s'il est incapable de respirer spontanément.

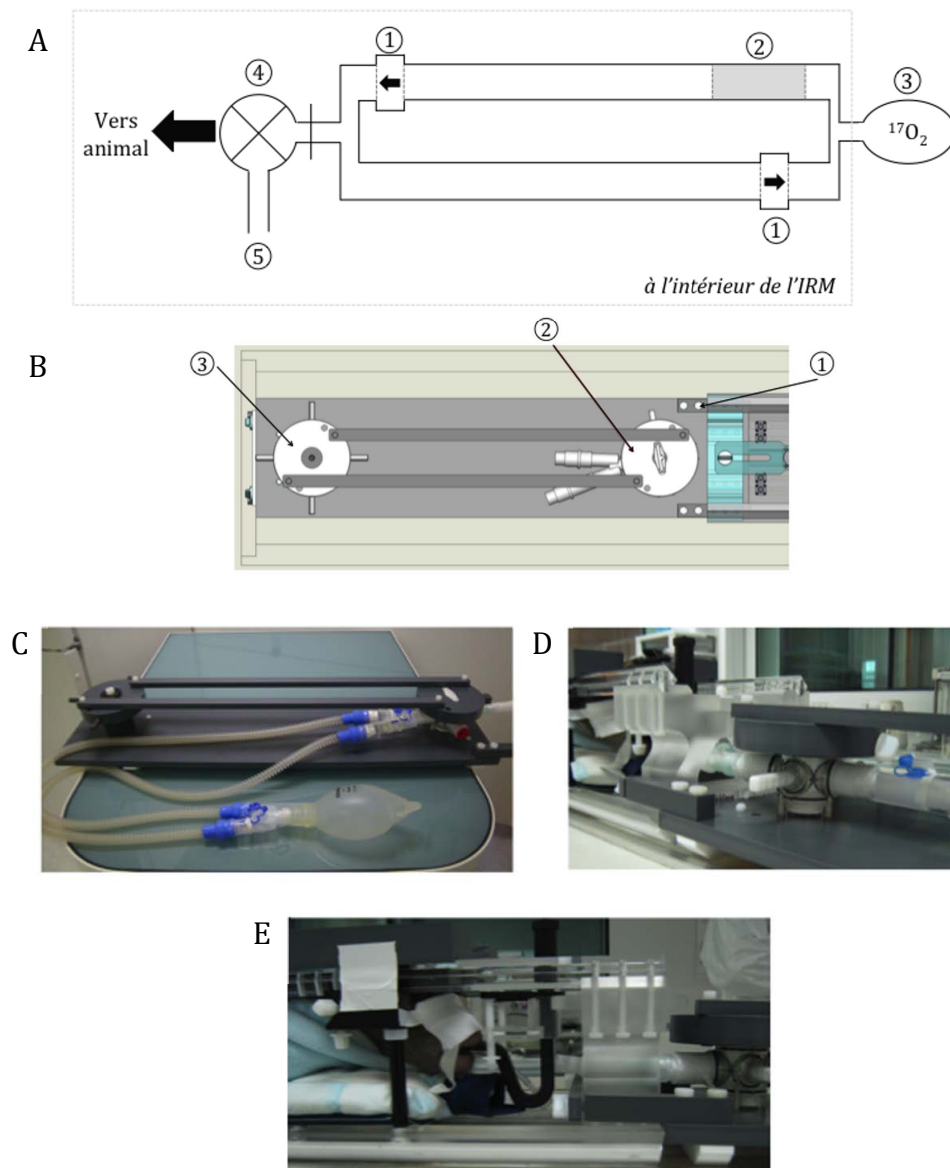


Figure 10.1.1: Système de ventilation construit spécifiquement pour l'étude. (A) Schéma du circuit fermé contenant le ^{17}O comprenant (1) des valves unidirectionnelles, (2) un absorbeur CO_2 , (3) un ballon de 1 L, (4) un robinet à 3 voies, (5) une entrée/sortie pour le mélange air+oxygène. Sur le schéma, l'orientation du robinet 3 voies est telle que le circuit contenant le ^{17}O est fermé. (B) Schéma du cadre sur lequel est fixé l'ensemble du circuit. (1) fixation au cadre stéréotaxique existant sur lequel est positionné l'animal, (2) robinet 3 voies connecté à (3) une manette permettant de changer l'ouverture du robinet 3 voies depuis l'extérieur de l'aimant. (C) Circuit de ventilation fixé au cadre permettant de pivoter le robinet 3 voies. (D-E) Raccord entre le cadre pour la ventilation, le cadre stéréotaxique et l'animal.

10.1.2. Imagerie spectroscopique du ^{17}O

Séquence 3D CSI

Nous avons choisi d'acquérir les images H_2^{17}O avec une séquence 3D CSI (Chemical Shift Imaging). Cette séquence, qui ne comporte que des encodages en phase, permet d'enregistrer l'information spectroscopique d'un ensemble de voxel. Elle a été implémentée à partir d'une séquence 2D CSI existante sur la console Vnmrj (Palo Alto, Ca, USA). Un temps d'écho ($\text{TE}=0.36$ ms) et un temps de répétition ($\text{TR}=4.5$ ms, de l'ordre du T_1) courts ont été choisis afin de minimiser les pertes par relaxation transversale et le temps d'acquisition ($\text{TA} = \text{TR} * N_{phx} * N_{phy} * N_{phz} * \text{NSA}$, où $N_{phx}/N_{phy}/N_{phz}$ correspondent aux nombres de pas pour l'encodage en phase et NSA est le nombre d'acquisitions moyennées) et ainsi avoir une bonne résolution temporelle. Enfin, une antenne simple accord ^{17}O de surface a été utilisée (KeepCoil, France).

Validation *in vitro*

La séquence a été validée *in vitro* à l'aide d'un fantôme sphérique de 8 cm de diamètre de sérum physiologique (NaCl 0.9%). Le pulse d'excitation de la séquence 3D CSI a été calibré à l'aide d'une séquence « Single Pulse » (pulse carré, durée 300 μs , 52 dB). Nous avons utilisé un champ de vue de 160x160x160 cm et une matrice d'encodage en phase de 16x16x16 (résolution spatiale de 1 cm isotropique). Pour tester la stabilité du signal, nous avons répété la séquence 161 fois ($\text{NSA}=1$, soit ~ 53 minutes d'acquisition). La figure 10.1.2 illustre la qualité des images obtenues après traitement des données sur Matlab (filtre de Hanning 3D dans le domaine fréquentiel, filtrage de la FID (Free Induction Decay) avec $\text{lb}=300$ Hz, transformée de Fourier). Le signal de H_2^{17}O dans chaque voxel est égal à l'intégrale sous la résonance du spectre correspondant. A partir des images reconstruites, nous avons mesuré le signal-sur-bruit ($\text{SNR}=\text{moyenne du signal } \text{H}_2^{17}\text{O} \text{ de 9 voxels divisée par la déviation standard du bruit}$) et tracé les profils selon les direction x et y (figure 10.1.3).

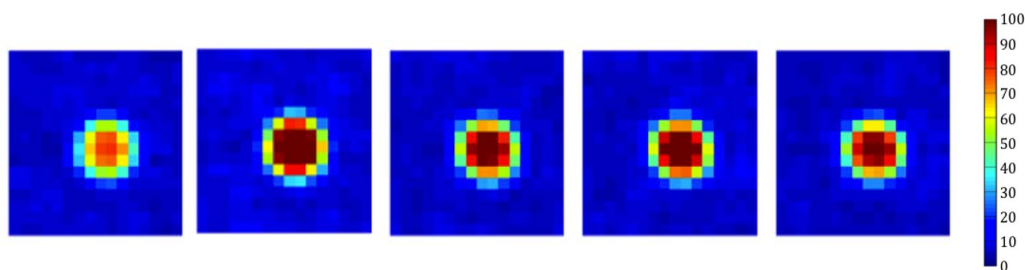


Figure 10.1.2: Coupes axiales reconstruites à partir des données acquises (1ère répétition) avec une séquence 3D CSI (la coupe à gauche correspond à la coupe axiale la plus haute). Le signal H_2^{17}O (u.a.) correspond à l'intégrale sous la résonance du spectre du voxel. Il a été normalisé par la déviation standard du bruit.

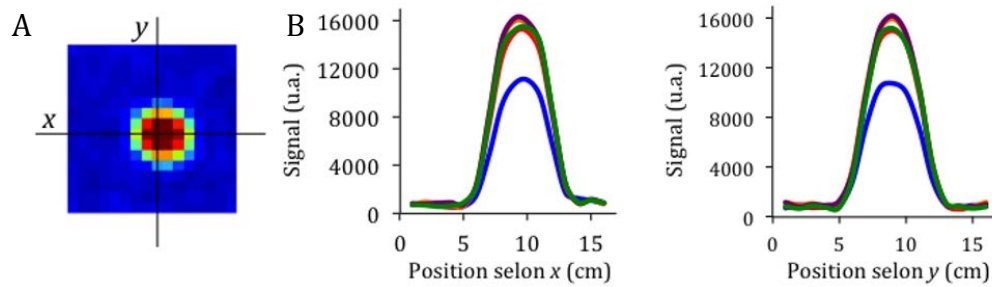


Figure 10.1.3: (A) Directions x et y selon lesquelles les profils ont été construits, (B) Profils obtenus pour les 5 coupes de la figure 10.1.2 : coupe 1 (bleu), coupe 2 (rouge), coupe 3 (orange), coupe 4 (violet), coupe 5 (vert).

La mesure du SNR, calculé pour les 5 coupes de la figure 10.1.2 et les 161 répétitions, montre que le signal reste relativement stable ($\text{SNR}=70\pm13/93\pm18/99\pm18/102\pm19/99\pm18$ pour les coupes 1/2/3/4/5). La largeur à mi-hauteur sur les profils selon les directions x et y correspond au diamètre de notre fantôme (ballon de ~ 8 cm de diamètre).

Validation *in vivo*

La séquence a ensuite été validée *in vivo*. Le protocole d'anesthésie, de suivi des constantes physiologiques et de positionnement du macaque (*macaca fascicularis*, 6.4 kg) est identique à celui présenté au chapitre 3. Le pulse d'excitation (pulse carré, durée 300 μs , 54 dB) a été calibré avec une séquence « Single Pulse ». Le champ de vue ($140\times140\times140$ mm³) et la taille de la matrice d'encodage de phase ($32\times32\times16$) nous a permis d'atteindre une résolution spatiale de $4.4\times4.4\times8$ mm³. Les coupes axiales obtenues après traitement des données sur Matlab (filtre de Hanning 3D dans le domaine fréquentiel, filtrage de la FID avec $\text{lb}=300$ Hz, transformée de Fourier) et intégration du signal sous la résonance de H_2^{17}O dans chaque voxel sont rapportées à la figure 10.1.4. Le très bon rapport signal-sur-bruit permet de distinguer certaines structures (par exemple les yeux sur la coupe axiale 4).

Nous avons également testé notre circuit en simulant une expérience ^{17}O : le circuit a été rempli avec un mélange air+oxygène et des images ^{17}O ont été acquises avant, pendant et après la ventilation de l'animal (*macaca fascicularis*, 5 kg) avec le mélange gazeux contenu dans le circuit. Le protocole d'anesthésie et de suivi de l'animal est identique à celui présenté au chapitre 3. Nous avons pu observer une variation du signal inférieure à 10%. Nous avons également vérifié que le CO_2 expiré par l'animal, lorsque celui-ci respire le mélange contenu dans le circuit fermé pendant 10 minutes, reste faible (ce qui signifie que le CO_2 est correctement capturé par notre absorbeur).

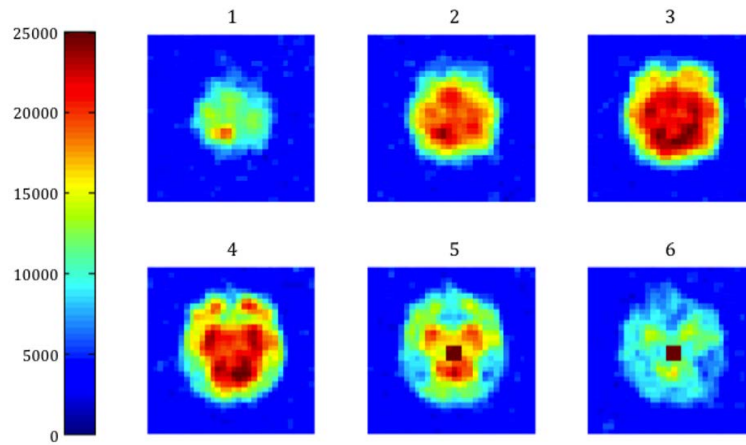


Figure 10.1.4 : Coupes axiales reconstruites à partir des données acquises avec une séquence 3D CSI (NSA=4, résolution spatiale $4.4 \times 4.4 \times 8 \text{ mm}^3$, temps d'acquisition $\sim 5 \text{ min}$). La coupe 1 est la coupe axiale la plus haute (haut du cerveau du macaque). Le signal H_2^{17}O (u.a.) correspond à l'intégrale sous la résonance du spectre du voxel.

La qualité des images est très encourageante. On peut en effet espérer suivre l'enrichissement en H_2^{17}O au cours de l'inhalation ^{17}O avec une excellente résolution temporelle. De plus, il semble envisageable d'utiliser les images acquises avec cette résolution spatiale ($4.4 \times 4.4 \times 8 \text{ mm}^3$) en abondance naturelle pour recalrer les images ^{17}O avec des images anatomiques ^1H .

10.1.3. Modèle analytique pour la mesure de CMRO_2

Description du modèle

Comme nous l'avons expliqué au chapitre 8, la concentration en H_2^{17}O dans chaque voxel du cerveau lors de l'inhalation de $^{17}\text{O}_2$ dépend de (i) la métabolisation des molécules de $^{17}\text{O}_2$ dans les mitochondries, (ii) de l'élimination de H_2^{17}O du tissu cérébral vers le réseau artério-veineux et (iii) de la recirculation du sang qui ramène le H_2^{17}O vers le tissu cérébral. Notons qu'une partie de H_2^{17}O présent dans la circulation est produite par le métabolisme énergétique périphérique. Enfin, une fraction est consommée progressivement par les réactions métaboliques du cycle de Krebs et de la glycolyse. Il est difficile de distinguer la fraction de H_2^{17}O produite dans les mitochondries du signal de H_2^{17}O provenant de la recirculation. Pour cela, Zhu et al. ont proposé d'injecter un bolus d'eau marquée directement dans l'artère carotide interne et de mesurer l'élimination du signal avec une antenne ^{17}O implantée (Zhu et al., 2005). Cependant, cette méthode est très invasive. La méthode proposée récemment par Atkinson et al. permet de s'en affranchir (Atkinson and Thulborn, 2010). Le modèle est résumé par la figure 10.1.5. La quantité de H_2^{17}O dans chaque voxel de l'image spectroscopique est décrite par l'équation (Atkinson and Thulborn, 2010) :

$$\frac{dM_v^{H_2^{17}\text{O}}(t)}{dt} = 2 * CMRO_2 * A^{17}\text{O}(t) - K_L * M_v^{H_2^{17}\text{O}}(t) + K_G * B^{H_2^{17}\text{O}}(t) \quad (10.1)$$

où $M_v^{H_2^{17}\text{O}}$ et $B^{H_2^{17}\text{O}}$ sont les quantités de H_2^{17}O (en moles) en excès par rapport à l'abondance naturelle dans le voxel et le sang, $A^{17}\text{O}$ est la fraction de ^{17}O en excès dans l'artère, K_G et K_L représentent l'entrée et la sortie de l'eau marquée du voxel (diffusion depuis et vers le réseau artérioveineux, consommation par les réactions métaboliques) et $CMRO_2$ correspond à la consommation du $^{17}\text{O}_2$ dans le cerveau (nombre de moles/min).

Une hypothèse importante du modèle est la forme exponentielle qu'on donne à $A^{17}\text{O}$, qui dépend de la fraction d'enrichissement du gaz inhalé en ^{17}O (α) et du taux caractéristique auquel la molécule de ^{17}O se lie à l'hémoglobine dans la circulation pulmonaire ($\rho = F_{A-V}/T_C$ où F_{A-V} est le taux de variation artérioveineuse pulmonaire en oxygène et T_C le temps moyen de circulation du sang). Des études menées chez l'Homme ont montré que $F_{A-V}=0.25$ et $T_C=20$ s (Kryger et al., 1981, Lassen et al., 1983, Pizzichetta and Drummond, 2009). En première approximation, nous utiliserons ces valeurs dans notre étude chez le macaque. La deuxième hypothèse est que la quantité $B^{H_2^{17}\text{O}}$ au temps t est proportionnelle à la quantité $A^{17}\text{O}$ réduite en eau par le métabolisme dans tout le corps et rejetée dans la circulation du début de l'inhalation jusqu'au temps t . Le facteur de proportionnalité est pris en compte dans la constante K_G . Ainsi on peut écrire (Atkinson and Thulborn, 2010):

$$A^{17}\text{O}(t) = \begin{cases} 0 & t < T_A \\ \alpha(1 - \exp(-\rho(t - T_A))) & T_A \leq t \leq T_B, \\ \alpha(1 - \exp(-\rho(T_B - T_A))) \exp(-\rho(t - T_B)) & t > T_B \end{cases} \quad B^{H_2^{17}\text{O}} \propto \int_0^t A^{17}\text{O}(t) dt \quad (10.2)$$

La combinaison des équations 10.1 et 10.2 donne une expression générale de $M_v^{H_2^{17}\text{O}}$ (Atkinson and Thulborn, 2010):

$$M_v^{H_2^{17}\text{O}}(t) = \begin{cases} D & t < T_A \\ 2\alpha * CMRO_2 \left(\frac{1}{K_L} - \frac{E_1}{K_L - \rho} \right) + \frac{K_G}{K_L} \alpha \left(t - T_A + \frac{K_L * E_1}{\rho(K_L - \rho)} - \frac{1}{\rho} - \frac{1}{K_L} \right) + c_1 * E_2 + D, & T_A \leq t \leq T_B \\ 2\alpha * CMRO_2 \frac{1 - e^{-\rho T_D}}{K_L - \rho} E_3 + \frac{K_G}{K_L} \alpha T_D - K_G * \alpha \frac{1 - e^{-\rho T_D}}{\rho(K_L - \rho)} E_3 + c_2 * E_4 + D, & t > T_B \end{cases} \quad (10.3)$$

$$E_1 = e^{-\rho(t-T_A)}, E_2 = e^{-K_L(t-T_A)}, E_3 = e^{-\rho(t-T_B)}, E_4 = e^{-K_L(t-T_B)}, T_D = T_B - T_A$$

$$c_1 = 2 \frac{\alpha CMRO_2 \rho}{K_L(K_L - \rho)} - \frac{K_G}{K_L} \alpha \left(\frac{K_L}{\rho(K_L - \rho)} - \frac{1}{\rho} - \frac{1}{K_L} \right), c_2 = -c_1(1 - e^{-K_L T_D})$$

D correspond au nombre de moles de $H_2^{17}O$ en abondance naturelle (c.-à-d. avant le début de l'inhalation de $^{17}O_2$), T_A et T_B sont les temps de début et fin d'inhalation de $^{17}O_2$.

Trois paramètres sont donc ajustés lors de la modélisation des données : $CMRO_2$, K_G et K_L . Une régression des moindres carrés est utilisée et l'erreur sur chacune de ces valeurs est ensuite déterminée à l'aide d'une analyse de Monte Carlo (protocole identique à celui présenté au chapitre 3).

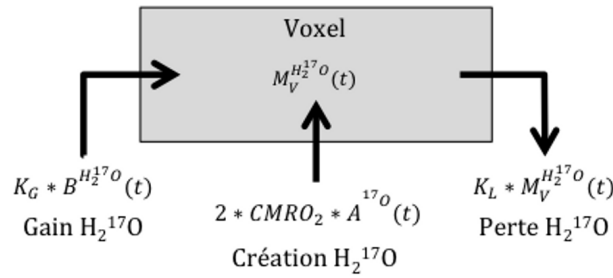


Figure 10.1.5: Schéma du modèle de Atkinson et al.. La quantité de $H_2^{17}O$ dans chaque voxel dépend de la conversion du $^{17}O_2$ inhalé en $H_2^{17}O$ et de l'entrée et sortie du flux de $H_2^{17}O$ liées à la recirculation du sang et à la capture par d'autres tissus. Figure adaptée de Atkinson and Thulborn, 2010.

10.2. Mesure de $CMRO_2$ *in vivo*

Trois expériences *in vivo* ont été réalisées. Une perte importante de signal au cours de la première expérience due à un défaut de l'antenne a significativement bruité nos données (perte de signal d'un facteur 2) et un problème de sauvegarde des données par la console Vnmrj (Palo Alto, CA, USA) au cours de la deuxième expérience, nous a fait perdre les données acquises au cours des cinq premières minutes de l'inhalation $^{17}O_2$. En conséquence, nous ne présenterons ici que les résultats obtenus lors de la dernière expérience.

10.2.1. Protocole expérimental et traitement des données

L'expérience a été réalisée sur un macaque à jeun (*macaca fascicularis*, 6.4 kg). Le protocole d'anesthésie, de positionnement et de suivi des constantes physiologiques est identique à celui présenté au chapitre 3. Les images $H_2^{17}O$ ont été acquises avec la séquence 3D CSI : champ de vue $140 \times 140 \times 140 \text{ mm}^3$, matrice d'encodage de phase : $16 \times 16 \times 16$, $NSA=1$, $TR/TE=4.5/0.36 \text{ ms}$ ce qui nous a permis d'atteindre une résolution spatiale de 8.75 mm isotropique et une durée

d'acquisition de ~ 18.5 s. La durée et la puissance de l'impulsion d'excitation ont été calibrées avec une séquence « Single Pulse » (impulsion carrée de $300\ \mu\text{s}$, 54 dB) puis vérifiées en acquérant plusieurs images ^{17}O en abondance naturelle avec la même durée et différentes puissances (de 50 à 58 dB) et en évaluant le rapport signal-sur-bruit. Afin de mesurer CMRO_2 , nous avons acquis de manière dynamique des images ^{17}O en abondance naturelle (5.4 minutes, « référence »), pendant l'inhalation de $^{17}\text{O}_2$ (~ 11 minutes pendant lesquelles l'animal respire spontanément le $^{17}\text{O}_2$ contenu dans le circuit fermé, $T_A=5.4$ min et $T_B=16.4$ min, « enrichissement »), et enfin après avoir arrêté l'inhalation (38.4 minutes, « élimination »). La durée très courte de chaque acquisition nous permet d'avoir une résolution temporelle de ~ 19.9 s et un temps total d'acquisition de ~ 55 minutes.

Les images 3D CSI ont été reconstruites sur Matlab : un filtrage de Hanning 3D est d'abord effectué dans l'espace fréquentiel, les FID (Free Induction Decay) sont également filtrées avec un $\text{lb}=300$ Hz, puis après avoir appliqué la transformée de Fourier, le signal dans chaque voxel est mesuré en intégrant le signal sous le pic de la résonance du H_2^{17}O . Enfin, les cinétiques d'enrichissement et d'élimination du signal H_2^{17}O ont été définies dans chaque voxel. Pour cela, le signal acquis pendant les 5 premières minutes est moyenné et converti en μmoles de $\text{H}_2^{17}\text{O}/\text{voxel}$. Si le voxel contient un mélange équivalent de substance blanche (teneur en H_2O chez l'Homme de 35.88 mM, Lentner, 1981) et de substance grise (teneur en H_2O chez l'Homme de 43.3 mM, Lentner, 1981) alors la quantité de H_2^{17}O en abondance naturelle par voxel est $D \sim 78.5\ \mu\text{mole}$. Afin de déterminer précisément cette quantité, il est nécessaire de segmenter des images ^1H anatomiques pour définir la proportion exacte de substance blanche (SB), substance grise (SG) et liquide céphalo-rachidien (LCR) dans chaque voxel. La valeur mesurée pour un mélange équivalent de SB et SG ($D \sim 78.5\ \mu\text{mole}/\text{voxel}$) est utilisée ici en première approximation pour convertir l'ensemble des données acquises en μmoles de $\text{H}_2^{17}\text{O}/\text{voxel}$.

10.2.2. Variation du signal H_2^{17}O

En abondance naturelle, le signal détecté nous permet de construire des cartes du signal H_2^{17}O sur six coupes axiales (figure 10.2.1). La figure 10.2.2 illustre la variation du signal H_2^{17}O au cours de l'acquisition dynamique pour la coupe 4. On peut observer une augmentation du signal après avoir débuté l'inhalation de $^{17}\text{O}_2$ ($T_A=5.4$ min). Après l'inhalation, le signal diminue progressivement et semble atteindre un plateau dont la valeur est plus haute que le niveau de référence (c.-à-d. l'abondance naturelle au début de l'acquisition). Une variation similaire est observée sur les cinq autres coupes. Néanmoins, le signal étant assez faible sur les coupes 1, 5 et 6, seule la variation du signal sur les coupes 2, 3 et 4 a été étudiée par la suite.

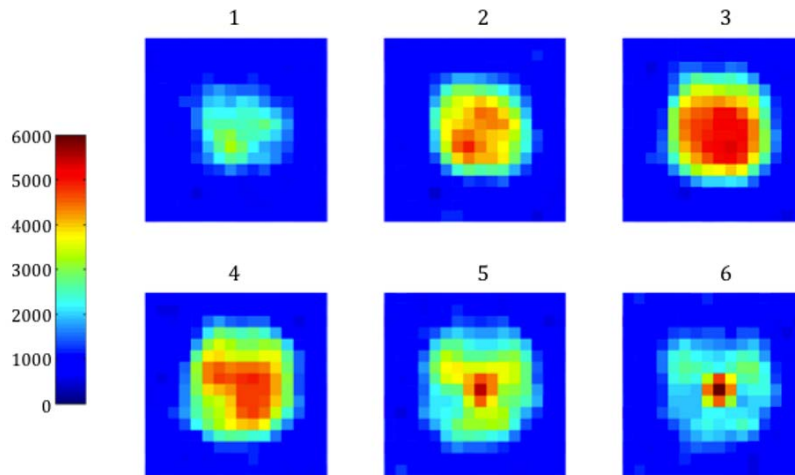


Figure 10.2.1 : Coupes axiales reconstruites à partir des données acquises avec une séquence 3D CSI au début de la dynamique (NSA=1, champ de vue =140x140x140, matrice encodage de phase 16x16x16, temps d'acquisition ~18.5 s). La coupe 1 est la coupe axiale la plus haute (haut du cerveau du macaque). Le signal $H_2^{17}O$ (u.a.) correspond à l'intégrale sous la résonance du spectre du voxel.

Les cinétiques d'enrichissement d'un ensemble de voxel de la coupe 4 sont rapportées à la figure 10.2.3. La qualité du signal nous permet d'observer des variations différentes dans chaque voxel. Ces différences sont liées à la composition en substance blanche et substance grise dans chaque voxel. Globalement, l'inhalation du ^{17}O pendant 10 minutes conduit à une augmentation du signal entre 40 et 50% dans chaque voxel. Ce résultat est comparable aux variations observées par Atkinson et al. chez l'Homme après une inhalation de $^{17}O_2$ (enrichissement 53%) de 15 minutes (Atkinson and Thulborn, 2010). Ces cinétiques ont ensuite été modélisées avec le modèle de Atkinson et al. présenté précédemment.

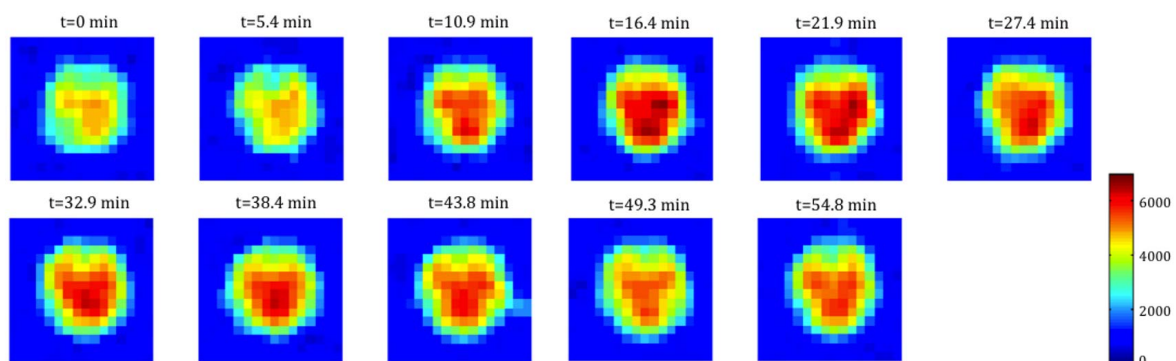


Figure 10.2.2: Variation du signal de $H_2^{17}O$ (u.a.) au cours de l'acquisition dynamique pour la coupe 4 de la figure 10.2.1.

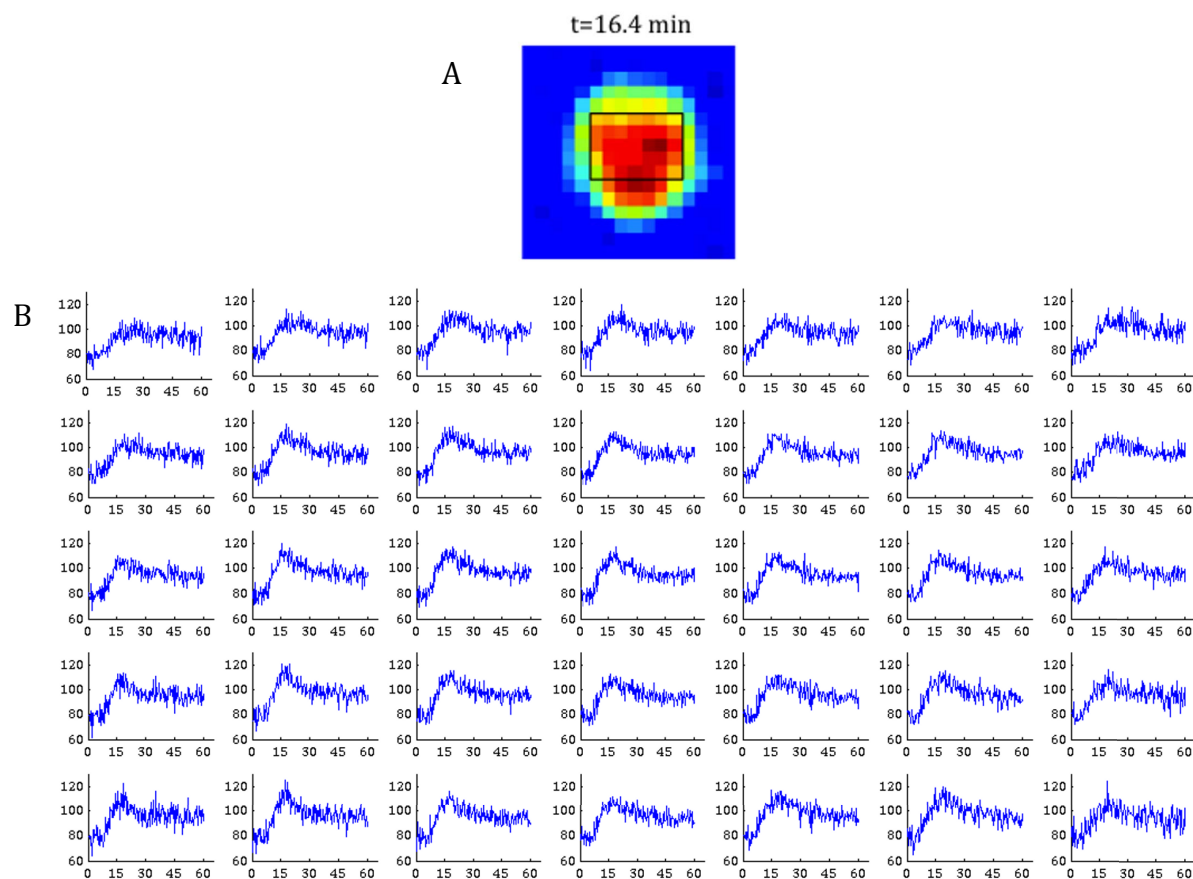


Figure 10.2.3: (A) Plusieurs voxels inclus dans la région encadrée sur l'image H_2^{17}O (coupe 4) ont été sélectionnés et (B) la variation du signal H_2^{17}O (en $\mu\text{mole/voxel}$) en fonction du temps d'acquisition pour ces différents voxels a été reconstruite.

10.2.3. Modélisation des données : mesure de CMRO_2

Le modèle de Atkinson et al. a été utilisé pour ajuster la variation de H_2^{17}O (convertie en $\mu\text{mole/g}$ de tissu en considérant que la densité de tissu cérébral est de 1g/mL , Barber et al., 1970 ; DiResta et al., 1990 ; Chaumeil et al., 2009) pour chaque voxel des coupes 2, 3 et 4. Trois paramètres ont été ajustés : CMRO_2 , K_G et K_L . L'erreur sur chacun de ces paramètres a été estimée à l'aide d'une analyse de Monte Carlo (protocole présenté au chapitre 3, 100 itérations). L'ajustement de la cinétique d'un voxel de la coupe 4 est illustré à la figure 10.2.4. Les cartes de CMRO_2 obtenues avec le meilleur ajustement pour les trois coupes sont rapportées à la figure 10.2.5.

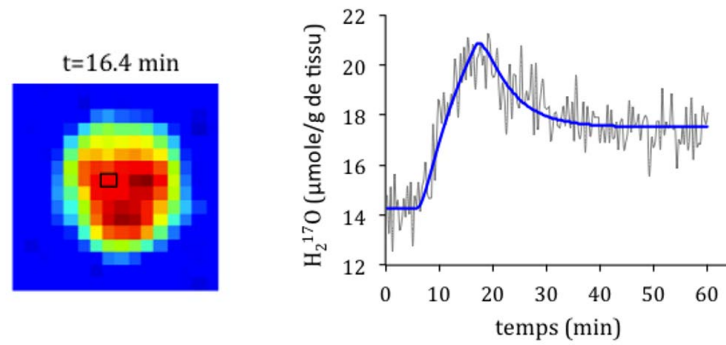


Figure 10.2.4: Ajustement de la variation de $H_2^{17}O$ (en $\mu\text{mole/g}$ de tissu) dans un voxel (indiqué sur l'image $H_2^{17}O$ à gauche, coupe 4) avec le modèle de Atkinson et al.. La modélisation des données nous permet d'extraire : $CMRO_2 = 0.8 \pm 0.1 \mu\text{mole/g}$ de tissu/min, $K_G = 0.08 \pm 0.01$ et $K_L = 0.18 \pm 0.02$ (moyenne \pm s.d. des valeurs obtenues avec l'analyse de Monte Carlo).

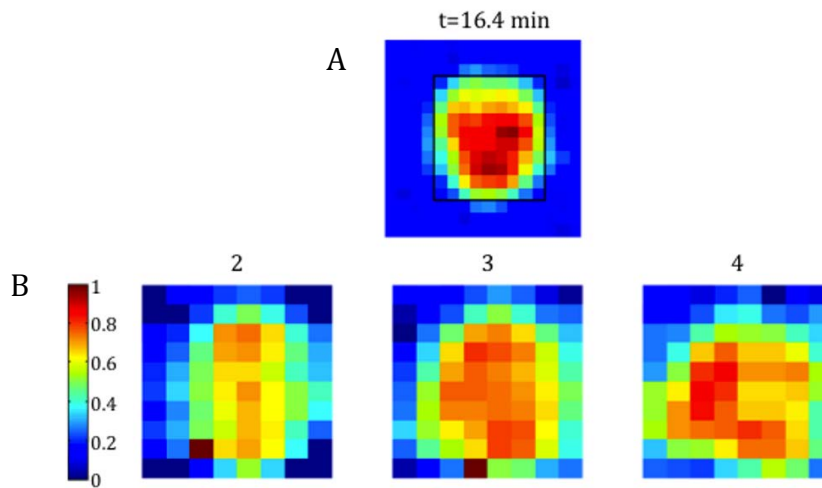


Figure 10.2.5: (A) Les voxels d'une région contenant l'ensemble du cerveau (encadré noir) ont été sélectionnés. (B) Dans cette région, le modèle de Atkinson et al. (meilleur ajustement des données) a été utilisé pour générer des cartes de $CMRO_2$ ($\mu\text{mole/g}$ de tissu/min) pour les coupes 2, 3 et 4.

L'analyse de Monte Carlo donne des valeurs moyennes $CMRO_2$, K_G et K_L (100 itérations) très proches des valeurs obtenues avec le meilleur ajustement. L'erreur sur la détermination de $CMRO_2$ (déviations standard des mesures obtenues avec les 100 itérations) est inférieure à $0.2 \mu\text{mole/g}$ de tissu/min pour les voxels inclus dans le cerveau.

10.2.4. Discussion

Les valeurs de $CMRO_2$ obtenues sont difficilement comparables avec les données de la littérature : notre étude est en effet la première à s'intéresser à la spectroscopie du ^{17}O chez le

macaque. Néanmoins, une valeur de $CMRO_2$ peut être dérivée de la mesure de V_{TCA} déterminée par spectroscopie du ^{13}C . Dans la chaîne respiratoire, un atome d'oxygène ($1/2\text{O}_2$) est consommé lors de la dégradation d'une mole de NADH ou une mole de FADH_2 , il est alors possible d'estimer la valeur de $CMRO_2$ par l'équation :

$$CMRO_2 \sim 2.5 * V_{TCA} + CMR_{Glc} \sim 3 * V_{TCA} \quad (10.3)$$

où CMR_{Glc} est la vitesse de consommation d'une mole de glucose par le cycle de Krebs (une mole de glucose est dégradée en deux moles de pyruvate qui sont consommées dans le cycle de Krebs, c.-à-d. $CMR_{Glc} \sim 0.5 * V_{TCA}$).

Ainsi, d'après les valeurs de V_{TCA} rapportées au chapitre précédent, une valeur de $CMRO_2 \sim 1.8$ $\mu\text{mole/g}$ de tissu/min serait attendue dans un large voxel ($V_{TCA} \sim 0.63$ $\mu\text{mole/g}$ de tissu/min, Chaumeil et al., 2009). Nos valeurs de $CMRO_2$ mesurées par spectroscopie du ^{17}O sont donc significativement plus basses (<1 $\mu\text{mole/g}$ de tissu/min pour les trois coupes étudiées). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cet écart.

Hypothèse 1 : Le modèle de Atkinson et al. a été développé pour la mesure de $CMRO_2$ chez l'Homme. En première approximation, certaines constantes (F_{A-V} le taux de variation artérioveineuse pulmonaire en oxygène et T_C le temps moyen de circulation du sang) ont été fixées arbitrairement aux valeurs données par Atkinson et al.. Il est cependant probable que ces deux paramètres, caractéristiques de la constante d'échange entre les tissus et le sang et de la vitesse de circulation du sang, sont différents chez le macaque anesthésié. Dans le but de déterminer F_{A-V} , nous avons réalisé une analyse des gaz du sang en effectuant des prélèvements artériels et veineux avant (anesthésie kétamine+xylazine) et après anesthésie de l'animal au propofol. Cette première analyse ne montre pas d'effet du propofol sur F_{A-V} mais montre une différence significative avec la valeur chez l'Homme : $F_{A-V}=0.13$. Néanmoins, deux essais supplémentaires sur deux macaques anesthésiés uniquement avec un mélange de kétamine+xylazine donnent des valeurs significativement plus élevées et proches de la valeur chez l'Homme : $F_{A-V}=0.25$. Nos prélèvements ont été réalisés au niveau de l'artère et veine caudale. Il est possible qu'au niveau pulmonaire, ces valeurs soient différentes. Ces tests montrent tout de même l'hétérogénéité des valeurs de F_{A-V} et potentiellement une différence entre la valeur chez l'Homme et le macaque. Afin de tester si un écart biaiserait significativement la détermination de $CMRO_2$, nous avons à nouveau ajusté nos cinétiques expérimentales en imposant $F_{A-V}=0.13$ (en supposant que T_C ne varie pas). Par exemple, pour la cinétique rapportée à la figure 10.2.4, une diminution de F_{A-V} d'un facteur 2, conduit à une augmentation de $CMRO_2$, K_G et K_L de plus de 40% soit

$CMRO_2 = 1.4 \pm 0.1$ $\mu\text{mole/g}$ de tissu/min (moyenne \pm s.d. des valeurs obtenues avec l'analyse de Monte Carlo). Cette valeur est plus proche de la valeur attendue. Un biais dans la détermination de F_{A-V} peut donc significativement influencer la mesure de $CMRO_2$.

Hypothèse 2 : Nous avons considéré que chaque voxel contient un mélange équivalent de substance blanche (SB) et substance grise (SG). Nous avons négligé la contamination due à la présence de liquide céphalo-rachidien (LCR) dans chaque voxel. Or la présence de LCR dans le voxel modifie la quantité de tissu et donc la quantification du signal $H_2^{17}O$ (cet effet est en plus renforcé par la réalisation du filtrage de Hanning lors du traitement des images ^{17}O). Dans le but de déterminer les proportions de SB, SG et LCR, il est possible de recalcr les images 1H anatomiques avec les images ^{17}O et de les segmenter (figure 10.2.5). Les cartes de SB, SG et LCR ainsi obtenues peuvent être filtrées et redimensionnées afin d'avoir la même résolution spatiale que les images ^{17}O . Par exemple, si le voxel contient 60% de SB et SG et 40% de LCR alors la valeur de $CMRO_2$ (pour la cinétique rapportée à la figure 10.2.4) est légèrement augmentée : $CMRO_2 = 1.0 \pm 0.1$ $\mu\text{mole/g}$ de tissu/min (moyenne \pm s.d. des valeurs obtenues avec l'analyse de Monte Carlo). La segmentation d'une image acquise au cours d'une expérience précédente avec Matlab (programme développé par Benoît Jehanno) avec un autre macaque (poids 4.9 kg) montre que les voxels d'intérêt peuvent contenir jusqu'à 30% de LCR. Cette fraction est non négligeable et doit donc être prise en considération au cours des prochaines expériences. L'achat d'une antenne double accord $^1H/^{17}O$ (KeepCoil, France) nous permettra de réaliser cette correction tout en facilitant le recalage des images.

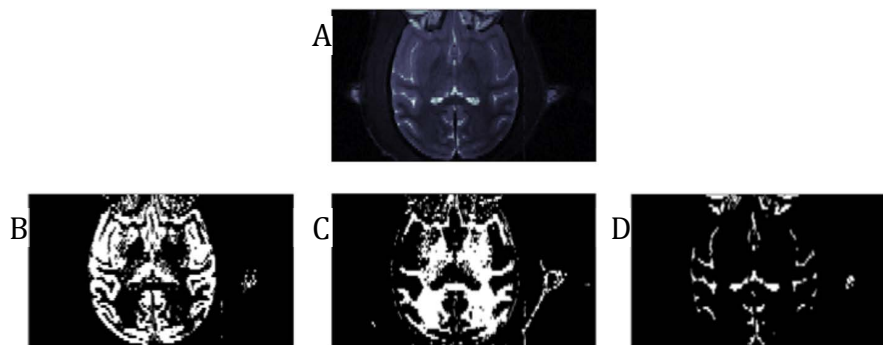


Figure 10.2.5: Segmentation automatique (programme Matlab développé par Benoît Jehanno) d'une coupe axiale : (A) coupe originale acquise avec une séquence pondérée T_2 , (B) substance grise, (C) substance blanche et (D) liquide céphalo-rachidien.

Hypothèse 3 : Dans le modèle de Atkinson et al., la quantité $B^{H_2^{17}O}$ (quantité de $H_2^{17}O$ en excès par rapport à l'abondance naturelle dans le sang) au temps t est proportionnelle à la quantité

$A^{17\text{O}}$ (fraction de ^{17}O en excès dans l'artère) réduite en eau du début de l'inhalation jusqu'au temps t . Ainsi après arrêt de l'inhalation du gaz $^{17}\text{O}_2$, $A^{17\text{O}}$ décroît rapidement jusqu'à zéro (le $^{17}\text{O}_2$ est rapidement remplacé par le $^{16}\text{O}_2$) et $B^{H_2^{17}\text{O}}$ reste constante (il est proportionnel à la quantité de $A^{17\text{O}}$ du début à la fin de l'inhalation). Cette hypothèse repose donc sur l'idée que le H_2^{17}O en excès dans le sang n'est pas éliminé. En réalité, il est probable que le H_2^{17}O soit en partie utilisé dans les réactions métaboliques dans le cerveau et dans les organes périphériques. Pour tester cette hypothèse, nous avons à nouveau ajusté la cinétique rapportée à la figure 10.2.4 en limitant l'analyse aux 35 premières minutes d'acquisition (soit 20 minutes d'acquisition après arrêt de l'inhalation $^{17}\text{O}_2$), en supposant que sur cette fenêtre temporelle plus courte le H_2^{17}O n'a été que très peu consommé. La valeur de CMRO_2 obtenue est légèrement augmentée : 1.1 ± 0.2 $\mu\text{mole/g}$ de tissu/min (moyenne \pm s.d. des valeurs obtenues avec l'analyse de Monte Carlo). Une idée pour vérifier *in vivo* cette hypothèse serait de réaliser des prélèvements de sang tout au long de l'expérience de spectroscopie du ^{17}O et d'imager ces différents échantillons afin d'en évaluer la quantité en eau marquée.

En conclusion, ces trois hypothèses sont plausibles, même si elles demandent encore vérification. Une erreur dans la valeur de F_{A-V} et T_c , une contamination du signal dans chaque voxel par la présence de LCR et un biais dans le modèle peuvent simultanément conduire à une sous-estimation importante de la valeur de CMRO_2 .

10.3. Conclusion

Cette étude est la première à s'intéresser à la mesure de CMRO_2 par spectroscopie RMN du ^{17}O dans le cerveau du macaque. Des développements méthodologiques et technologiques importants ont été nécessaires. La qualité des données permet de réaliser une mesure voxel-à-voxel de CMRO_2 . Le modèle utilisé actuellement (développé par Atkinson et al.) donne une valeur de CMRO_2 faible (<1 $\mu\text{mole/g}$ de tissu/min) par rapport à la valeur attendue ($\text{CMRO}_2 \sim 1.8$ $\mu\text{mole/g}$ de tissu/min estimée à partir d'une mesure de V_{TCA} dans un large voxel, Chaumeil et al., 2009). Le modèle repose sur plusieurs hypothèses fortes qui si elles sont erronées conduisent à une sous-estimation de notre valeur CMRO_2 . Plusieurs tests, détaillés précédemment, sont envisagés pour évaluer ces différentes hypothèses et estimer de manière plus robuste et précise la vraie valeur de CMRO_2 .

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La spectroscopie RMN des *noyaux X* permet d'étudier *in vivo* le métabolisme énergétique, c.-à-d. l'oxydation du glucose et la synthèse d'ATP dans les cellules neuronales et gliales. Au cours de ce travail de thèse, la spectroscopie du ^{13}C et du ^{17}O ont été développées dans le but d'estimer la vitesse du cycle de Krebs (V_{TCA}) et la vitesse de consommation de l'oxygène ($CMRO_2$) dans le cerveau du macaque *in vivo* à 7 T. Les développements réalisés en spectroscopie du ^{13}C ne nous ont pas permis de déterminer une valeur de V_{TCA} de manière robuste ni par détection indirecte (problèmes de décomposition spectrale et de modélisation) ni par détection directe (dépôt de puissance dû au découplage hétéronucléaire trop important). A l'opposé, les nombreux développements technologiques et méthodologiques (système de ventilation $^{17}\text{O}_2$, séquence 3D CSI, implémentation du modèle de Atkinson et al. pour estimer la valeur de $CMRO_2$) en spectroscopie du ^{17}O nous ont permis d'acquérir des images H_2^{17}O avec une excellente résolution temporelle (~ 20 s) et de construire des cartes de $CMRO_2$ avec une bonne résolution spatiale (1 cm isotropique). Néanmoins, les valeurs de $CMRO_2$ mesurées dans chaque voxel sont faibles ($< 1\mu\text{mol/g}$ de tissu/min) en comparaison aux valeurs attendues ($\sim 1.5\text{-}1.8\mu\text{mol/g}$ de tissu/min dans un large volume cérébral, Boumezbeur et al., 2004 ; Chaumeil et al., 2009). Plusieurs hypothèses, détaillées dans le chapitre 10, sont actuellement étudiées pour améliorer la modélisation de nos données et expliquer cet écart.

Les résultats obtenus par spectroscopie du ^{17}O sont très encourageants et montrent le grand potentiel de cette technique dans l'étude des maladies neurodégénératives où le métabolisme énergétique est atteint. Par exemple, dans le contexte de la maladie de Huntington (MH) une forte diminution de la vitesse du cycle de Krebs a été observée avec un modèle 3-NP (acide 3-nitropropionique, Brouillet et al., 1999) de la maladie (thèse de Fawzi Boumezbeur). Le 3-NP est une neurotoxine mitochondriale qui inhibe de manière irréversible l'enzyme succinate déshydrogénase et permet de reproduire les atteintes métaboliques, les troubles neurologiques et l'atrophie striatale de la MH (Beal et al., 1993 ; Brouillet et al., 2005). Une intoxication chronique au 3-NP permet de distinguer une phase « pré-symptomatique » durant laquelle des symptômes cognitifs apparaissent sans aucune lésion ou perte neuronale visible et une phase « symptomatique » où les lésions sont détectées (Brouillet et al., 1995 ; Palfi et al., 1996). La

meilleure résolution spatiale de la spectroscopie du ^{17}O en comparaison à la spectroscopie du ^{13}C présente ici un avantage majeur. L'acquisition des cartes cérébrales de CMRO_2 de macaques sains et intoxiqués au 3-NP en phase « pré-symptomatique », puis dans d'autres modèles de la maladie de Huntington (comme des modèles génétiques), permettrait de cartographier des différences de métabolisme énergétique mitochondrial.

CONCLUSION GENERALE

Le but de ce travail de thèse était de développer des séquences de spectroscopie RMN pour étudier la structure et la fonction des cellules neuronales et astrocytaires *in vivo*. Trois techniques ont été étudiées : la spectroscopie RMN du ^1H pondérée en diffusion pour étudier la compartimentation des métabolites à l'intérieur des cellules, et la spectroscopie RMN du ^{13}C et du ^{17}O pour explorer les réactions métaboliques de la respiration cellulaire.

Dans la première partie, une méthode originale a été développée : le coefficient de diffusion (ADC) des métabolites aux temps de diffusion longs a été mesuré *in vivo* à 7 T dans le cerveau de l'Homme et du macaque et des modèles analytiques simples mimant la structure cellulaire ont été développés. Nous avons montré que dans la substance blanche et la substance grise, l'ADC des métabolites, mesuré avec des temps de diffusion de ~ 100 à ~ 1000 ms, tend vers une valeur asymptotique non nulle, signifiant que les métabolites sont compartimentés dans des structures fibrillaires (neurones et prolongements astrocytaires) et ne sont pas confinés dans les organelles (mitochondries, noyaux...). La stabilité de l'ADC à une valeur proche de $D_{\text{intra}}/3$ (où D_{intra} correspond au coefficient de diffusion intracellulaire et dépend *a priori* de la tortuosité intracellulaire à courte échelle, en plus de la viscosité et de l'encombrement intracellulaire) suggère que la mesure de l'ADC sur cette gamme de temps devrait être sensible à une variation des paramètres cytoplasmiques « locaux ». A l'opposé, il semble difficile avec les temps utilisés d'être sensible à une atrophie neuronale ou une hypertrophie astrocytaire. Néanmoins, la mesure de l'ADC des métabolites avec des temps de diffusion jusqu'à ~ 2000 ms suggère que des différences de longueur de fibres entre les métabolites neuronaux et astrocytaires peuvent être détectées. Pour renforcer cette tendance, il est nécessaire de couvrir une gamme de temps plus large. Une nouvelle stratégie a été introduite : l'étude des états d'aimantation à longue durée de vie (« long-lived states »). En théorie, des temps de diffusion de plusieurs secondes pourraient être atteints. En parallèle, l'implémentation d'une nouvelle séquence, MAG-STEAM, suggère que nos données expérimentales acquises avec la séquence STEAM ne sont pas ou peu biaisées par les termes croisés entre les gradients de diffusion et les gradients d'hétérogénéités de champ magnétique dont l'amplitude varie pendant le temps de mélange, à condition qu'elle reste stable « par morceaux », entre la première et deuxième impulsion $\pi/2$ d'une part, et entre la troisième impulsion $\pi/2$ et l'acquisition d'autre part. Enfin, la séquence STEAM pondérée en diffusion a été

développée sur l'IRM 11.7 T afin de mesurer l'ADC des métabolites chez la souris. Des mesures sont toujours en cours pour confirmer les résultats obtenus sur deux souris.

Dans la deuxième partie, nous avons montré les limites de la spectroscopie du ^{13}C à 7 T *in vivo*. Une première méthode de détection indirecte (acquisitions de spectres ^1H) a été étudiée. Cependant, malgré la qualité des spectres et la résolution temporelle obtenue, la modélisation des données et la quantification de V_{TCA} ne sont pas satisfaisantes. La séquence 3D ISIS-DEPT, permettant une détection directe, a été implémentée et testée *in vitro* sur un fantôme de glucose pour augmenter la résolution spectrale. Néanmoins, la puissance nécessaire pour le découplage hétéronucléaire ne nous a pas permis de poursuivre les expériences *in vivo*. Une dernière approche a alors été présentée pour étudier le métabolisme énergétique *in vivo* : la spectroscopie du ^{17}O . Un système de ventilation pour l'inhalation du $^{17}\text{O}_2$ a été conçu spécifiquement pour notre étude. Une séquence 3D CSI et un modèle analytique ont été implémentés. Les résultats actuels nous permettent de construire des cartes de $CMRO_2$ *in vivo* avec une résolution spatiale de 1 cm isotropique. Cependant, les valeurs de $CMRO_2$ sont plus faibles que les valeurs attendues. Des améliorations dans la modélisation des données sont en cours pour expliquer et corriger les différences observées.

Les travaux réalisés ont permis de développer deux techniques complémentaires présentant un intérêt particulier pour répondre à des questions fondamentales (par exemple la caractérisation de la structure cellulaire) mais également pour l'étude de nombreuses maladies neurodégénératives en phase « pré-symptomatique ». Dans le contexte de la maladie de Huntington, une atteinte du métabolisme énergétique et une accumulation d'agrégat de huntingtine mutée sont observées. L'acquisition de cartes de $CMRO_2$ permettrait de visualiser une altération du métabolisme mitochondrial tandis que la mesure du coefficient de diffusion à différents temps permettrait d'être sensible aux changements intracellulaires.

En conclusion, ces travaux s'inscrivent dans les thématiques de recherche de l'équipe de spectroscopie RMN du Laboratoire des Maladies Neurodégénératives au CEA de Fontenay-aux-Roses (CEA CNRS URA 2210). D'une part, les mesures de l'ADC aux temps longs chez la souris pourront être regroupées avec les mesures aux temps de diffusion courts réalisées chez le rat et la souris par Charlotte Marchadour et Clémence Ligneul, permettant ainsi d'avoir une vision globale de la cinétique du coefficient de diffusion. D'autre part, les mesures de $CMRO_2$ pourront être couplées à des mesures de la vitesse de synthèse de l'ATP par spectroscopie du ^{31}P dont la mesure dans une large voxel a été validée par Brice Tiret chez le macaque à 7 T.

BIBLIOGRAPHIE

- Abe, O., Okubo, T., Hayashi, N., Saito, N., Iriguchi, N., Shirouzu, I., Kojima, Y., Masumoto, T., Ohtomo, K., Sasaki, Y., 2000. Temporal Changes of the Apparent Diffusion Coefficients of Water and Metabolites in Rats With Hemispheric Infarction: Experimental Study of Transhemispheric Diaschisis in the Contralateral Hemisphere at 7 Tesla. *J Cereb Blood Flow Metab* 20, 726–735.
- Agutter, P.S., Malone, P.C., Wheatley, D.N., 1995. Intracellular transport mechanisms: a critique of diffusion theory. *J Theor Biol* 176, 261–272.
- Ahuja, P., Sarkar, R., Vasos, P.R., Bodenhausen, G., 2009. Long-lived States in Multiple-Spin Systems. *ChemPhysChem* 10, 2217–2220.
- Alexander, D.C., Hubbard, P.L., Hall, M.G., Moore, E.A., Ptito, M., Parker, G.J.M., Dyrby, T.B., 2010. Orientationally invariant indices of axon diameter and density from diffusion MRI. *NeuroImage* 52, 1374–1389.
- Alger, J.R., Sillerud, L.O., Behar, K.L., Gillies, R.J., Shulman, R.G., Gordon, R.E., Shae, D., Hanley, P.E., 1981. In vivo carbon-13 nuclear magnetic resonance studies of mammals. *Science* 214, 660–662.
- Alpár, A., Ueberham, U., Brückner, M.K., Seeger, G., Arendt, T., Gärtner, U., 2006. Different dendrite and dendritic spine alterations in basal and apical arbors in mutant human amyloid precursor protein transgenic mice. *Brain Research* 1099, 189–198.
- Arrasate, M., Finkbeiner, S., 2012. Protein aggregates in Huntington's disease. *Experimental Neurology* 238, 1–11.
- Artemov, D., Bhujwala, Z.M., Glickson, J.D., 1995. In vivo selective measurement of (1-13C)-glucose metabolism in tumors by heteronuclear cross polarization. *Magn Reson Med* 33, 151–155.
- Assaf, Y., Blumenfeld-Katzir, T., Yovel, Y., Basser, P.J., 2008. Axciliber: A method for measuring axon diameter distribution from diffusion MRI. *Magn Reson Med* 59, 1347–1354.
- Assaf, Y., Cohen, Y., 1998. In vivo and in vitro bi-exponential diffusion of N -acetyl aspartate (NAA) in rat brain: a potential structural probe? *NMR Biomed* 11, 67–74.
- Assaf, Y., Cohen, Y., 1999. Structural information in neuronal tissue as revealed by q-space diffusion NMR spectroscopy of metabolites in bovine optic nerve. *NMR Biomed* 12, 335–344.
- Assaf, Y., Pasternak, O., 2008. Diffusion tensor imaging (DTI)-based white matter mapping in brain research: a review. *J Mol Neurosci* 34, 51–61.
- Atkinson, I.C., Thulborn, K.R., 2010. Feasibility of mapping the tissue mass corrected bioscale of cerebral metabolic rate of oxygen consumption using 17-oxygen and 23-sodium MR imaging in a human brain at 9.4 T. *NeuroImage* 51, 723–733.

- Axelrod, D., Koppel, D.E., Schlessinger, J., Elson, E., Webb, W.W., 1976. Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophys J* 16, 1055–1069.
- Balinov, B., Jonsson, B., Linse, P., Soderman, O., 1993. The NMR Self-Diffusion Method Applied to Restricted Diffusion. Simulation of Echo Attenuation from Molecules in Spheres and between Planes. *J Magn Reson A* 104, 17–25.
- Barber, T.W., Brockway, J.A., Higgins, L.S., 1970. The Density of Tissues in and About the Head. *Acta Neurologica Scandinavica* 46, 85–92.
- Beal, M.F., 1992. Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses? *Ann Neurol* 31, 119–130.
- Beal, M.F., Brouillet, E., Jenkins, B.G., Ferrante, R.J., Kowall, N.W., Miller, J.M., Storey, E., Srivastava, R., Rosen, B.R., Hyman, B.T., 1993. Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J Neurosci* 13, 4181–4192.
- Beavis, A.D., Lehninger, A.L., 1986. The upper and lower limits of the mechanistic stoichiometry of mitochondrial oxidative phosphorylation. Stoichiometry of oxidative phosphorylation. *Eur J Biochem* 158, 315–322.
- Bendall, M.R., de Hollander, J.A., Arias-Mendoza, F., Rothman, D.L., Behar, K.L., Shulman, R.G., 1985. Application of multipulse NMR to observe ¹³C-labeled metabolites in biological systems. *Magn Reson Med* 2, 56–64.
- Bennett, K.M., Schmainda, K.M., Bennett, R.T., Rowe, D.B., Lu, H., Hyde, J.S., 2003. Characterization of continuously distributed cortical water diffusion rates with a stretched-exponential model. *Magn Reson Med* 50, 727–734.
- Berne, B.J., Pecora, R., 2000. *Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics*. Courier Dover Publications.
- Boumezbeur, F., Besret, L., Valette, J., Vaufrey, F., Henry, P.-G., Slavov, V., Giacomini, E., Hantraye, P., Bloch, G., Lebon, V., 2004. NMR measurement of brain oxidative metabolism in monkeys using ¹³C-labeled glucose without a ¹³C radiofrequency channel. *Magn Reson Med* 52, 33–40.
- Boyer, P.D., 1997. The ATP synthase--a splendid molecular machine. *Annu Rev Biochem* 66, 717–749.
- Brand, A., Richter-Landsberg, C., Leibfritz, D., 1993. Multinuclear NMR studies on the energy metabolism of glial and neuronal cells. *Dev Neurosci* 15, 289–298.
- Brangwynne, C.P., Koenderink, G.H., MacKintosh, F.C., Weitz, D.A., 2008. Cytoplasmic diffusion: molecular motors mix it up. *J Cell Biol* 183, 583–587.

- Branzoli, F., Ercan, E., Webb, A., Ronen, I., 2014. The interaction between apparent diffusion coefficients and transverse relaxation rates of human brain metabolites and water studied by diffusion-weighted spectroscopy at 7 T. *NMR Biomed* 27, 495–506.
- Branzoli, F., Techawiboonwong, A., Kan, H., Webb, A., Ronen, I., 2013. Functional diffusion-weighted magnetic resonance spectroscopy of the human primary visual cortex at 7 T. *Magn Reson Med* 69, 303–309.
- Brouillet, E., Condé, F., Beal, M.F., Hantraye, P., 1999. Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. *Prog Neurobiol* 59, 427–468.
- Brouillet, E., Hantraye, P., Ferrante, R.J., Dolan, R., Leroy-Willig, A., Kowall, N.W., Beal, M.F., 1995. Chronic mitochondrial energy impairment produces selective striatal degeneration and abnormal choreiform movements in primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 7105–7109.
- Brouillet, E., Jacquard, C., Bizat, N., Blum, D., 2005. 3-Nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease. *J Neurochem* 95, 1521–1540.
- Budde, M.D., Frank, J.A., 2010. Neurite beading is sufficient to decrease the apparent diffusion coefficient after ischemic stroke. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 14472–14477.
- Budde, M.D., Janes, L., Gold, E., Turtzo, L.C., Frank, J.A., 2011. The contribution of gliosis to diffusion tensor anisotropy and tractography following traumatic brain injury: validation in the rat using Fourier analysis of stained tissue sections. *Brain* 134, 2248–2260.
- Callaghan, P.T., Coy, A., MacGowan, D., Packer, K.J., Zelaya, F.O., 1991. Diffraction-like effects in NMR diffusion studies of fluids in porous solids. *Nature* 351, 467–469.
- Campbell, N.A., Reece, J.B., 2011. *Campbell biology*. Benjamin Cummings, Boston.
- Carravetta, M., Levitt, M.H., 2004. Long-lived nuclear spin states in high-field solution NMR. *J Am Chem Soc* 126, 6228–6229.
- Cavadini, S., Vasos, P.R., 2008. Singlet states open the way to longer time-scales in the measurement of diffusion by NMR spectroscopy. *Concepts in Magnetic Resonance Part A* 32A, 68–78.
- Chaumeil, M.M., Valette, J., Baligand, C., Brouillet, E., Hantraye, P., Bloch, G., Gaura, V., Rialland, A., Krystkowiak, P., Verny, C., Damier, P., Remy, P., Bachoud-Levi, A.C., Carlier, P., Lebon, V., 2012. pH as a biomarker of neurodegeneration in Huntington's disease : a translational rodent-human MRS study. *J Cereb Blood Flow Metab* 32, 771–779.
- Chaumeil, M.M., Valette, J., Guillermier, M., Brouillet, E., Boumezbeur, F., Herard, A.-S., Bloch, G., Hantraye, P., Lebon, V., 2009. Multimodal neuroimaging provides a highly consistent picture of energy metabolism, validating ³¹P MRS for measuring brain ATP synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 3988–3993.

- Chklovskii, D.B., Schikorski, T., Stevens, C.F., 2002. Wiring Optimization in Cortical Circuits. *Neuron* 34, 341–347.
- Choi, J.-K., Dedeoglu, A., Jenkins, B.G., 2007. Application of MRS to mouse models of neurodegenerative illness. *NMR Biomed* 20, 216–237.
- Chvátal, A., Anděrová, M., Kirchhoff, F., 2007. Three-dimensional confocal morphometry – a new approach for studying dynamic changes in cell morphology in brain slices. *J Anat* 210, 671–683.
- Cohen, Y., Assaf, Y., 2002. High b-value q-space analyzed diffusion-weighted MRS and MRI in neuronal tissues – a technical review. *NMR in Biomedicine* 15, 516–542.
- Cory, D.G., Garroway, A.N., 1990. Measurement of translational displacement probabilities by NMR: an indicator of compartmentation. *Magn Reson Med* 14, 435–444.
- Cotts, R., Hoch, M.J., Sun, T., Markert, J., 1989. Pulsed field gradient stimulated echo methods for improved NMR diffusion measurements in heterogeneous systems. *J Magn Reson* (1969) 83, 252–266.
- Cui, W., Zhu, X.-H., Vollmers, M.L., Colonna, E.T., Adriany, G., Tramm, B., Dubinsky, J.M., Öz, G., 2013. Non-invasive measurement of cerebral oxygen metabolism in the mouse brain by ultra-high field (17)O MR spectroscopy. *J Cereb Blood Flow Metab* 33, 1846–1849.
- Cuntz, H., Mathy, A., Häusser, M., 2012. A scaling law derived from optimal dendritic wiring. *Proc Natl Acad Sci USA* 109, 11014–11018.
- De Crespigny, A.J., D’Arceuil, H.E., Engelhorn, T., Moseley, M.E., 2000. MRI of focal cerebral ischemia using (17)O-labeled water. *Magn Reson Med* 43, 876–883.
- De Graaf, R.A. de, 1998. *In Vivo NMR Spectroscopy: Principles and Techniques*. Wiley.
- De Graaf, R.A., Luo, Y., Terpstra, M., Garwood, M., 1995. Spectral editing with adiabatic pulses. *J Magn Reson B* 109, 184–193.
- De Graaf, R.A., van Kranenburg, A., Nicolay, K., 2000. In vivo (31)P-NMR diffusion spectroscopy of ATP and phosphocreatine in rat skeletal muscle. *Biophys J* 78, 1657–1664.
- Dijkhuizen, R.M., de Graaf, R.A., Tulleken, K.A.F., Nicolay, K., 1999. Changes in the Diffusion of Water and Intracellular Metabolites After Excitotoxic Injury and Global Ischemia in Neonatal Rat Brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 19, 341–349.
- DiResta, G.R., Lee, J., Lau, N., Ali, F., Galicich, J.H., Arbit, E., 1990. Measurement of brain tissue density using pycnometry. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 51, 34–36.
- Doddrell, D.M., Pegg, D.T., Bendall, M.R., 1982. Distortionless enhancement of NMR signals by polarization transfer. *J Magn Reson* (1969) 48, 323–327.

- Does, M.D., Parsons, E.C., Gore, J.C., 2003. Oscillating gradient measurements of water diffusion in normal and globally ischemic rat brain. *Magn Reson Med* 49, 206–215.
- Dreher, W., Busch, E., Leibfritz, D., 2001. Changes in apparent diffusion coefficients of metabolites in rat brain after middle cerebral artery occlusion measured by proton magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson Med* 45, 383–389.
- Du, F., Zhu, X.-H., Qiao, H., Zhang, X., Chen, W., 2007. Efficient in vivo ³¹P magnetization transfer approach for noninvasively determining multiple kinetic parameters and metabolic fluxes of ATP metabolism in the human brain. *Magn Reson Med* 57, 103–114.
- Du, F., Zhu, X.-H., Zhang, Y., Friedman, M., Zhang, N., Ugurbil, K., Chen, W., 2008. Tightly coupled brain activity and cerebral ATP metabolic rate. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 6409–6414.
- Ellegood, J., Hanstock, C.C., Beaulieu, C., 2005. Trace apparent diffusion coefficients of metabolites in human brain using diffusion weighted magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson Med* 53, 1025–1032.
- Ellegood, J., Hanstock, C.C., Beaulieu, C., 2006. Diffusion tensor spectroscopy (DTS) of human brain. *Magn Reson Med* 55, 1–8.
- Ellegood, J., Hanstock, C.C., Beaulieu, C., 2011. Considerations for measuring the fractional anisotropy of metabolites with diffusion tensor spectroscopy. *NMR Biomed* 24, 270–280.
- Fiala, J.C., Harris, K.M., 1999. Dendrite structure, in: *Dendrites*, Oxford University Press.
- Fiat, D., Kang, S., 1993. Determination of the rate of cerebral oxygen consumption and regional cerebral blood flow by non-invasive ¹⁷O in vivo NMR spectroscopy and magnetic resonance imaging. Part 2. Determination of CMRO₂ for the rat by ¹⁷O NMR, and CMRO₂, rCBF and the partition coefficient for the cat by ¹⁷O MRI. *Neurol Res* 15, 7–22.
- Filley, C.M., 2010. White Matter: Organization and Functional Relevance. *Neuropsychol Rev* 20, 158–173.
- Fitzpatrick, S.M., Hetherington, H.P., Behar, K.L., Shulman, R.G., 1990. The flux from glucose to glutamate in the rat brain in vivo as determined by ¹H-observed, ¹³C-edited NMR spectroscopy. *J Cereb Blood Flow Metab* 10, 170–179.
- Franker, M.A.M., Hoogenraad, C.C., 2013. Microtubule-based transport - basic mechanisms, traffic rules and role in neurological pathogenesis. *J Cell Sci* 126, 2319–2329.
- Galvosas, P., Stallmach, F., Kärgner, J., 2004. Background gradient suppression in stimulated echo NMR diffusion studies using magic pulsed field gradient ratios. *J Magn Reson* 166, 164–173.
- Garwood, M., DelaBarre, L., 2001. The return of the frequency sweep: designing adiabatic pulses for contemporary NMR. *J Magn Reson* 153, 155–177.

- Gruetter, R., 1993. Automatic, localized in vivo adjustment of all first- and second-order shim coils. *Magn Reson Med* 29, 804–811.
- Gudbjartsson, H., Maier, S.E., Mulkern, R.V., Mórocz, I.A., Patz, S., Jolesz, F.A., 1996. Line scan diffusion imaging. *Magn Reson Med* 36, 509–519.
- Hahn, E.L., 1950. Spin Echoes. *Phys Rev* 80, 580–594.
- Hakumäki, J.M., Poptani, H., Puumalainen, A.-M., Loimas, S., Paljärvi, L.A., Ylä-Herttuala, S., Kauppinen, R.A., 1998. Quantitative ¹H Nuclear Magnetic Resonance Diffusion Spectroscopy of BT4C Rat Glioma during Thymidine Kinase-mediated Gene Therapy in Vivo: Identification of Apoptotic Response. *Cancer Res* 58, 3791–3799.
- Han, S.H., Song, Y.K., Cho, F.H., Ryu, S., Cho, G., Song, Y.-Q., Cho, H., 2011. Magnetic field anisotropy based MR tractography. *J Magn Reson* 212, 386–393.
- Harada, M., Uno, M., Hong, F., Hisaoka, S., Nishitani, H., Matsuda, T., 2002. Diffusion-weighted in vivo localized proton MR spectroscopy of human cerebral ischemia and tumor. *NMR Biomed* 15, 69–74.
- Harrison, R.V., Harel, N., Panesar, J., Mount, R.J., 2002. Blood capillary distribution correlates with hemodynamic-based functional imaging in cerebral cortex. *Cereb Cortex* 12, 225–233.
- Henry, P., Tkáč, I., Gruetter, R., 2003b. ¹H-localized broadband ¹³C NMR spectroscopy of the rat brain in vivo at 9.4 T. *Magn Reson Med* 50, 684–692.
- Henry, P.-G., Adriany, G., Deelchand, D., Gruetter, R., Marjanska, M., Oz, G., Seaquist, E.R., Shestov, A., Uğurbil, K., 2006. In vivo ¹³C NMR spectroscopy and metabolic modeling in the brain: a practical perspective. *Magn Reson Imaging* 24, 527–539.
- Henry, P.-G., Öz, G., Provencher, S., Gruetter, R., 2003a. Toward dynamic isotopomer analysis in the rat brain in vivo: automatic quantitation of ¹³C NMR spectra using LCModel. *NMR Biomed* 16, 400–412.
- Herculano-Houzel, S., 2014. The glia/neuron ratio: How it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. *Glia* 62, 1377–1391.
- Hinkle, P.C., 2005. P/O ratios of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 1706, 1–11.
- Hinkle, P.C., Yu, M.L., 1979. The phosphorus/oxygen ratio of mitochondrial oxidative phosphorylation. *J Biol Chem* 254, 2450–2455.
- Hirokawa, N., 1998. Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science* 279, 519–526.

- Hoffmann, S.H., Begovatz, P., Nagel, A.M., Umathum, R., Schommer, K., Bachert, P., Bock, M., 2011. A measurement setup for direct 17O MRI at 7 T. *Magn Reson Med* 66, 1109–1115.
- Hopkins, A.L., Barr, R.G., 1987. Oxygen-17 compounds as potential NMR T2 contrast agents: enrichment effects of H₂(17)O on protein solutions and living tissues. *Magn Reson Med* 4, 399–403.
- Jara, H., Wehrli, F.W., 1994. Determination of Background Gradients with Diffusion MR Imaging. *J Magn Reson Imaging* 4, 787–797.
- Jensen, J.H., Helpern, J.A., 2010. MRI quantification of non-Gaussian water diffusion by kurtosis analysis. *NMR Biomed* 23, 698–710.
- Jespersen, S.N., Kroenke, C.D., Østergaard, L., Ackerman, J.J.H., Yablonskiy, D.A., 2007. Modeling dendrite density from magnetic resonance diffusion measurements. *NeuroImage* 34, 1473–1486.
- Kan, H.E., Techawiboonwong, A., van Osch, M.J.P., Versluis, M.J., Deelchand, D.K., Henry, P.-G., Marjańska, M., van Buchem, M.A., Webb, A.G., Ronen, I., 2012. Differences in apparent diffusion coefficients of brain metabolites between grey and white matter in the human brain measured at 7 T. *Magn Reson Med* 67, 1203–1209.
- Karlicek Jr., R., Lowe, I., 1980. A modified pulsed gradient technique for measuring diffusion in the presence of large background gradients. *J Magn Reson (1969)* 37, 75–91.
- Keith, A.D., Snipes, W., Mehlhorn, R.J., Gunter, T., 1977. Factors restricting diffusion of water-soluble spin labels. *Biophys J* 19, 205–218.
- Klose, U., 1990. In vivo proton spectroscopy in presence of eddy currents. *Magn Reson Med* 14, 26–30.
- Krebs, H.A., 1940. The citric acid cycle and the Szent-Gyorgyi cycle in pigeon breast muscle. *Biochem J* 34, 775–779.
- Kroenke, C.D., Ackerman, J.J.H., Yablonskiy, D.A., 2004. On the nature of the NAA diffusion attenuated MR signal in the central nervous system. *Magn Reson Med* 52, 1052–1059.
- Kryger, M.H., 1981. *Pathophysiology of Respiration*. Wiley, New York.
- Kwong, K.K., Belliveau, J.W., Chesler, D.A., Goldberg, I.E., Weisskoff, R.M., Poncelet, B.P., Kennedy, D.N., Hoppel, B.E., Cohen, M.S., Turner, R., 1992. Dynamic magnetic resonance imaging of human brain activity during primary sensory stimulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 5675–5679.
- Lassen, N.A., Henriksen, O., Sejrsen, P., 2011. Indicator Methods for Measurement of Organ and Tissue Blood Flow, in: *Comprehensive Physiology*. John Wiley & Sons, Inc.

- Le Bihan, D., 2003. Looking into the functional architecture of the brain with diffusion MRI. *Nat Rev Neurosci* 4, 469-480.
- Lebon, V., Petersen, K.F., Cline, G.W., Shen, J., Mason, G.F., Dufour, S., Behar, K.L., Shulman, G.I., Rothman, D.L., 2002. Astroglial contribution to brain energy metabolism in humans revealed by ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy: elucidation of the dominant pathway for neurotransmitter glutamate repletion and measurement of astrocytic oxidative metabolism. *J Neurosci* 22, 1523–1531.
- Lee, C.P., Gu, Q., Xiong, Y., Mitchell, R.A., Ernster, L., 1996. P/O ratios reassessed: mitochondrial P/O ratios consistently exceed 1.5 with succinate and 2.5 with NAD-linked substrates. *FASEB J* 10, 345–350.
- Lee, W.-C.A., Huang, H., Feng, G., Sanes, J.R., Brown, E.N., So, P.T., Nedivi, E., 2006. Dynamic Remodeling of Dendritic Arbors in GABAergic Interneurons of Adult Visual Cortex. *PLoS Biol* 4.
- Lei, H., Ugurbil, K., Chen, W., 2003a. Measurement of unidirectional Pi to ATP flux in human visual cortex at 7 T by using in vivo ^{31}P magnetic resonance spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 14409–14414.
- Lei, H., Zhu, X.-H., Zhang, X.-L., Ugurbil, K., Chen, W., 2003b. In vivo ^{31}P magnetic resonance spectroscopy of human brain at 7 T: an initial experience. *Magn Reson Med* 49, 199–205.
- Lentner, C., 1981. Geigy Scientific Tables, Ciba-Geigy. Basel, p. 222.
- Levitt, M.H., Freeman, R., 1981. Composite pulse decoupling. *J Magn Reson* (1969) 43, 502–507.
- Levitt, M.H., Freeman, R., Frenkiel, T., 1982. Broadband heteronuclear decoupling. *J Magn Reson* (1969) 47, 328–330.
- Linse, P., Soderman, O., 1995. The Validity of the Short-Gradient-Pulse Approximation in NMR Studies of Restricted Diffusion. Simulations of Molecules Diffusing between Planes, in Cylinders and Spheres. *J Magn Reson A* 116, 77–86.
- Liu, Z., Zheng, D., Wang, X., Zhang, J., Xie, S., Xiao, J., Jiang, X., 2011. Apparent diffusion coefficients of metabolites in patients with MELAS using diffusion-weighted MR spectroscopy. *AJNR Am J Neuroradiol* 32, 898–902.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J., 2000. Electron Transport and Oxidative Phosphorylation <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21528/>
- López-Muñoz, F., Boya, J., Alamo, C., 2006. Neuron theory, the cornerstone of neuroscience, on the centenary of the Nobel Prize award to Santiago Ramón y Cajal. *Brain Research Bulletin* 70, 391–405.

- Lu, M., Zhang, Y., Ugurbil, K., Chen, W., Zhu, X.-H., 2013. In vitro and in vivo studies of ^{17}O NMR sensitivity at 9.4 and 16.4 T. *Magn Reson Med* 69, 1523–1527.
- Lundgaard, I., Osório, M.J., Kress, B.T., Sanggaard, S., Nedergaard, M., 2013. White matter astrocytes in health and disease. *Neuroscience*. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.10.050
- Magistretti, P.J., 1999. Brain energy metabolism, in: *Fundamental Neuroscience*. San Diego : Academic Press, p. 389-413.
- Marchadour, C., Brouillet, E., Hantraye, P., Lebon, V., Valette, J., 2012. Anomalous diffusion of brain metabolites evidenced by diffusion-weighted magnetic resonance spectroscopy in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab* 32, 2153–2160.
- Mason, G.F., Gruetter, R., Rothman, D.L., Behar, K.L., Shulman, R.G., Novotny, E.J., 1995. Simultaneous determination of the rates of the TCA cycle, glucose utilization, alpha-ketoglutarate/glutamate exchange, and glutamine synthesis in human brain by NMR. *J Cereb Blood Flow Metab* 15, 12–25.
- Mason, G.F., Rothman, D.L., Behar, K.L., Shulman, R.G., 1992. NMR determination of the TCA cycle rate and alpha-ketoglutarate/glutamate exchange rate in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 12, 434–447.
- Mastro, A.M., Babich, M.A., Taylor, W.D., Keith, A.D., 1984. Diffusion of a small molecule in the cytoplasm of mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 81, 3414–3418.
- Mattiello, J., Basser, P.J., Le Bihan, D., 1997. The b matrix in diffusion tensor echo-planar imaging. *Magn Reson Med* 37, 292–300.
- Mattiello, J., Basser, P.J., Lebihan, D., 1994. Analytical Expressions for the b Matrix in NMR Diffusion Imaging and Spectroscopy. *J Magn Reson A* 108, 131–141.
- Mays, R.W., Beck, K.A., Nelson, W.J., 1994. Organization and function of the cytoskeleton in polarized epithelial cells: a component of the protein sorting machinery. *Curr. Opin. Cell Biol* 6, 16–24.
- McEwen, B.S., Grafstein, B., 1968. Fast and slow components in axonal transport of protein. *J Cell Biol* 38, 494–508.
- Meiboom, S., 1961. Nuclear Magnetic Resonance Study of the Proton Transfer in Water. *J Chem Phys* 34, 375–388.
- Meraz-Ríos, M.A., Toral-Rios, D., Franco-Bocanegra, D., Villeda-Hernández, J., Campos-Peña, V., 2013. Inflammatory process in Alzheimer's Disease. *Front Integr Neurosci* 7, 59.
- Merboldt, K.-D., Hörstermann, D., Hänicke, W., Bruhn, H., Frahm, J., 1993. Molecular self-diffusion of intracellular metabolites in rat brain in vivo Investigated by Localized Proton NMR Diffusion Spectroscopy. *Magn Reson Medicine* 29, 125–129.

- Mitchell, P., 1961. Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic type of Mechanism. *Nature* 191, 144–148.
- Morris, G.A., Freeman, R., 1979. Enhancement of nuclear magnetic resonance signals by polarization transfer. *J Am Chem Soc* 101, 760–762.
- Morris, R.L., Hollenbeck, P.J., 1995. Axonal transport of mitochondria along microtubules and F-actin in living vertebrate neurons. *J Cell Biol* 131, 1315–1326.
- Najac, C., Marchadour, C., Guillermier, M., Houitte, D., Slavov, V., Brouillet, E., Hantraye, P., Lebon, V., Valette, J., 2014. Intracellular metabolites in the primate brain are primarily localized in long fibers rather than in cell bodies, as shown by diffusion-weighted magnetic resonance spectroscopy. *NeuroImage* 90, 374–380.
- Narazaki, M., Kanazawa, Y., Koike, S., Ando, K., Ikehira, H., 2013. Quantitative 17O imaging towards oxygen consumption study in tumor bearing mice at 7 T. *Magn Reson Imaging* 31, 643–650.
- Nedergaard, M., Ransom, B., Goldman, S.A., 2003. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci* 26, 523–530.
- Neeman, M., Freyer, J.P., Sillerud, L.O., 1990. Pulsed-gradient spin-echo diffusion studies in nmr imaging. Effects of the imaging gradients on the determination of diffusion coefficients. *J Magn Reson* (1969) 90, 303–312.
- Neeman, M., Freyer, J.P., Sillerud, L.O., 1991. A simple method for obtaining cross-term-free images for diffusion anisotropy studies in NMR microimaging. *Magn Reson Med* 21, 138–143.
- Nelson, W.J., 1991. Cytoskeleton functions in membrane traffic in polarized epithelial cells. *Semin Cell Biol* 2, 375–385.
- Nicolay, K., Braun, K.P.J., Graaf, R.A. de, Dijkhuizen, R.M., Kruiskamp, M.J., 2001. Diffusion NMR spectroscopy. *NMR Biomed* 14, 94–111.
- Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M., Kinosita, K., 1997. Direct observation of the rotation of F1-ATPase. *Nature* 386, 299–302.
- Oberheim, N.A., Goldman, S.A., Nedergaard, M., 2012. Heterogeneity of Astrocytic Form and Function. *Methods Mol Biol* 814, 23–45.
- Oberheim, N.A., Takano, T., Han, X., He, W., Lin, J.H., Wang, F., Xu, Q., Wyatt, J.D., Pilcher, W., Ojemann, J.G., Ransom, B.R., Goldman, S.A., Nedergaard, M., 2009. Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *J Neurosci* 29, 3276.
- Oberheim, N.A., Tian, G.-F., Han, X., Peng, W., Takano, T., Ransom, B., Nedergaard, M., 2008. Loss of Astrocytic Domain Organization in the Epileptic Brain. *J Neurosci* 28, 3264–3276.

- Ordidge, R.J., Connelly, A., Lohman, J.A.B., 1986. Image-selected in Vivo spectroscopy (ISIS). A new technique for spatially selective nmr spectroscopy. *J Magn Reson* (1969) 66, 283–294.
- Ottersen, O.P., Zhang, N., Walberg, F., 1992. Metabolic compartmentation of glutamate and glutamine: Morphological evidence obtained by quantitative immunocytochemistry in rat cerebellum. *Neuroscience* 46, 519–534.
- Palfi, S., Ferrante, R.J., Brouillet, E., Beal, M.F., Dolan, R., Guyot, M.C., Peschanski, M., Hantraye, P., 1996. Chronic 3-nitropropionic acid treatment in baboons replicates the cognitive and motor deficits of Huntington's disease. *J Neurosci* 16, 3019–3025.
- Palombo, M., Gentili, S., Bozzali, M., Macaluso, E., Capuani, S., 2014. New insight into contrast in diffusional kurtosis images: does it depend on magnetic susceptibility? *Magn Reson Med* doi:10.1002/mrm25308.
- Patel, A.B., de Graaf, R.A., Mason, G.F., Rothman, D.L., Shulman, R.G., Behar, K.L., 2005. The contribution of GABA to glutamate/glutamine cycling and energy metabolism in the rat cortex in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 5588–5593.
- Patel, T.B., Clark, J.B., 1979. Synthesis of N-acetyl-L-aspartate by rat brain mitochondria and its involvement in mitochondrial/cytosolic carbon transport. *Biochem J* 184, 539–546.
- Pekar, J., Ligeti, L., Ruttner, Z., Lyon, R.C., Sinnwell, T.M., van Gelderen, P., Fiat, D., Moonen, C.T., McLaughlin, A.C., 1991. In vivo measurement of cerebral oxygen consumption and blood flow using 17O magnetic resonance imaging. *Magn Reson Med* 21, 313–319.
- Perge, J.A., Koch, K., Miller, R., Sterling, P., Balasubramanian, V., 2009. How the Optic Nerve Allocates Space, Energy Capacity, and Information. *J Neurosci* 29, 7917–7928.
- Pfeuffer, J., Tkác, I., Gruetter, R., 2000. Extracellular-intracellular distribution of glucose and lactate in the rat brain assessed noninvasively by diffusion-weighted 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab* 20, 736–746.
- Pizzichetta, F., Drummond, G.B., 2009. Systemic recirculation assessed in apnoeic anaesthetized patients using carbon dioxide concentration measurements during stepwise expiration. *Br J Anaesth* 102, 698–703.
- Posse, S., Cuenod, C.A., Le Bihan, D., 1993. Human brain: proton diffusion MR spectroscopy. *Radiology* 188, 719–725.
- Price, W.S., Stilbs, P., Jönsson, B., Söderman, O., 2001. Macroscopic background gradient and radiation damping effects on high-field PGSE NMR diffusion measurements. *J Magn Reson* 150, 49–56.
- Provencher, S.W., 1993. Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra. *Magn Reson Med* 30, 672–679.

- Purves, D., Augustine, George J., Fitzpatrick, David, Hall, William C., LaMantia, Anthony-Samuel, McNamara, James O., Williams S. Mark, 2004. Neuroscience, 3rd Edition. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc, 2004.
- Reddy, R., Stolpen, A.H., Charagundla, S.R., Insko, E.K., Leigh, J.S., 1996. ^{17}O -decoupled ^1H detection using a double-tuned coil. *Magn Reson Imaging* 14, 1073–1078.
- Reese, T. g., Heid, O., Weisskoff, R. m., Wedeen, V. j., 2003. Reduction of eddy-current-induced distortion in diffusion MRI using a twice-refocused spin echo. *Magn Reson Med* 49, 177–182.
- Rodrigues, T.B., Valette, J., Bouzier-Sore, A.-K., 2013. ^{13}C NMR spectroscopy applications to brain energy metabolism. *Front Neuroenergetics* 5, 9.
- Ronen, I., Ercan, E., Webb, A., 2013. Axonal and glial microstructural information obtained with diffusion-weighted magnetic resonance spectroscopy at 7T. *Front Integr Neurosci* 7, 13.
- Ronen, I., Lee, J.H., Merkle, H., Ugurbil, K., Navon, G., 1997. Imaging $\text{H}_2(^{17}\text{O})$ distribution in a phantom and measurement of metabolically produced $\text{H}_2(^{17}\text{O})$ in live mice by proton NMR. *NMR Biomed* 10, 333–340.
- Ronen, I., Merkle, H., Ugurbil, K., Navon, G., 1998. Imaging of H_2^{17}O distribution in the brain of a live rat by using proton-detected ^{17}O MRI. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 12934–12939.
- Ronen, I., Navon, G., 1994. A new method for proton detection of $\text{H}_2(^{17}\text{O})$ with potential applications for functional MRI. *Magn Reson Med* 32, 789–793.
- Rothman, D.L., Behar, K.L., Hetherington, H.P., den Hollander, J.A., Bendall, M.R., Petroff, O.A., Shulman, R.G., 1985. ^1H -Observe/ ^{13}C -decouple spectroscopic measurements of lactate and glutamate in the rat brain in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 1633–1637.
- Santamaria, F., Wils, S., De Schutter, E., Augustine, G.J., 2006. Anomalous diffusion in Purkinje cell dendrites caused by spines. *Neuron* 52, 635–648.
- Sarkar, R., Ahuja, P., Vasos, P.R., Bodenhausen, G., 2008. Measurement of slow diffusion coefficients of molecules with arbitrary scalar couplings via long-lived spin states. *ChemPhysChem* 9, 2414–2419.
- Saxton, M.J., Jacobson, K., 1997. Single-particle tracking: applications to membrane dynamics. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 26, 373–399.
- Schwille, P., 2001. Fluorescence correlation spectroscopy and its potential for intracellular applications. *Cell Biochem Biophys* 34, 383–408.
- Shaka, A.J., Keeler, J., Freeman, R., 1983a. Evaluation of a new broadband decoupling sequence: WALTZ-16. *J Magn Reson* (1969) 53, 313–340.

- Shaka, A.J., Keeler, J., Frenkiel, T., Freeman, R., 1983b. An improved sequence for broadband decoupling: WALTZ-16. *J Magn Reson* (1969) 52, 335–338.
- Sherwin, R.P., Richters, A., Richters, V., 1967. The occurrence of a cyclosis-like phenomenon in human lung cancer cells in vitro. *Cancer Res* 27, 152–158.
- Sherwood, C.C., Holloway, R.L., Erwin, J.M., Schleicher, A., Zilles, K., Hof, P.R., 2004. Cortical orofacial motor representation in Old World monkeys, great apes, and humans. I. Quantitative analysis of cytoarchitecture. *Brain Behav Evol* 63, 61–81.
- Shestov, A.A., Valette, J., Uğurbil, K., Henry, P.-G., 2007. On the reliability of (^{13}C) metabolic modeling with two-compartment neuronal-glial models. *J Neurosci Res* 85, 3294–3303.
- Sibson, N.R., Dhankhar, A., Mason, G.F., Behar, K.L., Rothman, D.L., Shulman, R.G., 1997. In vivo ^{13}C NMR measurements of cerebral glutamine synthesis as evidence for glutamate-glutamine cycling. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 2699–2704.
- Sibson, N.R., Shen, J., Mason, G.F., Rothman, D.L., Behar, K.L., Shulman, R.G., 1998. Functional energy metabolism: in vivo ^{13}C -NMR spectroscopy evidence for coupling of cerebral glucose consumption and glutamatergic neuronal activity. *Dev Neurosci* 20, 321–330.
- Smith, S.M., 2002. Fast robust automated brain extraction. *Human Brain Mapping* 17, 143–155.
- Stejskal, E.O., Tanner, J.E., 1965. Spin Diffusion Measurements: Spin Echoes in the Presence of a Time-Dependent Field Gradient. *J Chem Phys* 42, 288–292.
- Stepisnik, J., n.d. Time-dependent self-diffusion by NMR spin-echo. *Physica B, Condensed matter* 183, 343–350.
- Stolpen, A.H., Reddy, R., Leigh, J.S., 1997. ^{17}O -decoupled proton MR spectroscopy and imaging in a tissue model. *J Magn Reson* 125, 1–7.
- Sun, D., Lye-Barthel, M., Masland, R.H., Jakobs, T.C., 2010. Structural remodeling of fibrous astrocytes after axonal injury. *J Neurosci* 30, 14008–14019.
- Sun, P.Z., Seland, J.G., Cory, D., 2003. Background gradient suppression in pulsed gradient stimulated echo measurements. *J Magn Reson* 161, 168–173.
- Tanner, J.E., 1970. Use of the Stimulated Echo in NMR Diffusion Studies. *J Chem Phys* 52, 2523–2526.
- Tannús, A., Garwood, M., 1997. Adiabatic pulses. *NMR Biomed* 10, 423–434.
- Tkac, I., Dubinsky, J.M., Keene, C.D., Gruetter, R., Low, W.C., 2007. Neurochemical changes in Huntington R6/2 mouse striatum detected by in vivo ^1H NMR spectroscopy. *J Neurochem* 100, 1397–1406.

- Torrey, H.C., 1956. Bloch Equations with Diffusion Terms. *Phys Rev* 104, 563–565.
- Upadhyay, J., Hallock, K., Ducros, M., Kim, D.-S., Ronen, I., 2008. Diffusion tensor spectroscopy and imaging of the arcuate fasciculus. *NeuroImage* 39, 1–9.
- Upadhyay, J., Hallock, K., Erb, K., Kim, D.-S., Ronen, I., 2007. Diffusion properties of NAA in human corpus callosum as studied with diffusion tensor spectroscopy. *Magn Reson Med* 58, 1045–1053.
- Urenjak, J., Williams, S.R., Gadian, D.G., Noble, M., 1993. Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy unambiguously identifies different neural cell types. *J Neurosci* 13, 981–989.
- Valette, J., Chaumeil, M., Guillermier, M., Bloch, G., Hantraye, P., Lebon, V., 2008. Diffusion-weighted NMR spectroscopy allows probing of ¹³C labeling of glutamate inside distinct metabolic compartments in the brain. *Magn Reson Med* 60, 306–311.
- Valette, J., Giraudeau, C., Marchadour, C., Djemai, B., Geffroy, F., Ghaly, M.A., Le Bihan, D., Hantraye, P., Lebon, V., Lethimonnier, F., 2012. A new sequence for single-shot diffusion-weighted NMR spectroscopy by the trace of the diffusion tensor. *Magn Reson Med* 68, 1705–1712.
- Valette, J., Guillermier, M., Besret, L., Boumezbeur, F., Hantraye, P., Lebon, V., 2005. Optimized diffusion-weighted spectroscopy for measuring brain glutamate apparent diffusion coefficient on a whole-body MR system. *NMR Biomed* 18, 527–533.
- Valette, J., Guillermier, M., Besret, L., Hantraye, P., Bloch, G., Lebon, V., 2006. Isoflurane strongly affects the diffusion of intracellular metabolites, as shown by ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy of the monkey brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 27, 588–596.
- Van den Bergh, A.J., van den Boogert, H.J., Heerschap, A., 1998. Heteronuclear cross polarization for enhanced sensitivity of in vivo ¹³C MR spectroscopy on a clinical 1.5 T MR system. *J Magn Reson* 135, 93–98.
- Van der Toorn, A., Dijkhuizen, R.M., Tulleken, C.A.F., Nicolay, K., 1996. Diffusion of metabolites in normal and ischemic rat brain measured by localized ¹H MRS. *Magn Reson Med* 36, 914–922.
- Van Heeswijk, R.B., Laus, S., Morgenthaler, F.D., Gruetter, R., 2007. Relaxivity of Gd-based contrast agents on X nuclei with long intrinsic relaxation times in aqueous solutions. *Magn Reson Imaging* 25, 821–825.
- Watt, I.N., Montgomery, M.G., Runswick, M.J., Leslie, A.G.W., Walker, J.E., 2010. Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria. *Proc Natl Acad Sci* doi:10.1073/pnas.1011099107
- Weiss, M., Hashimoto, H., Nilsson, T., 2003. Anomalous protein diffusion in living cells as seen by fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys J* 84, 4043–4052.

- Wheatley, D.N., 1999. On the vital role of fluid movement in organisms and cells: a brief historical account from Harvey to Coulson, extending the hypothesis of circulation. *Med Hypotheses* 52, 275–284.
- Wick, M., Nagatomo, Y., Prielmeier, F., Frahm, J., 1995. Alteration of Intracellular Metabolite Diffusion in Rat Brain In Vivo During Ischemia and Reperfusion. *Stroke* 26, 1930–1934.
- Wood, E.T., Ronen, I., Techawiboonwong, A., Jones, C.K., Barker, P.B., Calabresi, P., Harrison, D., Reich, D.S., 2012. Investigating Axonal Damage in Multiple Sclerosis by Diffusion Tensor Spectroscopy. *J Neurosci* 32, 6665–6669.
- Xin, L., Schaller, B., Mlynarik, V., Lu, H., Gruetter, R., 2013. Proton T1 relaxation times of metabolites in human occipital white and gray matter at 7 T. *Magn Reson Med* 69, 931–936.
- Yablonskiy, D.A., Sukstanskii, A.L., 2010. Theoretical models of the diffusion weighted MR signal. *NMR Biomed* 23, 661–681.
- Yi, K., Unruh, J.R., Deng, M., Slaughter, B.D., Rubinstein, B., Li, R., 2011. Dynamic maintenance of asymmetric meiotic spindle position through Arp2/3-complex-driven cytoplasmic streaming in mouse oocytes. *Nat Cell Biol* 13, 1252–1258.
- Yoshida, M., Muneyuki, E., Hisabori, T., 2001. ATP synthase--a marvellous rotary engine of the cell. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 669–677.
- Zhang, K., Sejnowski, T.J., 2000. A universal scaling law between gray matter and white matter of cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 5621–5626.
- Zhang, N., Zhu, X.-H., Lei, H., Ugurbil, K., Chen, W., 2004. Simplified Methods for Calculating Cerebral Metabolic Rate of Oxygen Based on 17O Magnetic Resonance Spectroscopic Imaging Measurement During a Short 17O2 Inhalation. *J Cereb Blood Flow Metab* 24, 840–848.
- Zhang, Y., Brady, M., Smith, S., Jan. Segmentation of brain MR images through a hidden Markov random field model and the expectation-maximization algorithm. *IEEE Transactions on Medical Imaging* 20, 45–57.
- Zheng, D.D., Liu, Z.H., Fang, J., Wang, X.Y., Zhang, J., 2012. The effect of age and cerebral ischemia on diffusion-weighted proton MR spectroscopy of the human brain. *AJNR Am J Neuroradiol* 33, 563–568.
- Zhong, J., Kennan, R.P., Gore, J.C., 1991. Effects of susceptibility variations on NMR measurements of diffusion. *J Magn Reson* (1969) 95, 267–280.
- Zhu, X.-H., Chen, J.M., Tu, T.-W., Chen, W., Song, S.-K., 2013. Simultaneous and noninvasive imaging of cerebral oxygen metabolic rate, blood flow and oxygen extraction fraction in stroke mice. *NeuroImage* 64, 437–447.

Zhu, X.-H., Zhang, N., Zhang, Y., Zhang, X., Ugurbil, K., Chen, W., 2005. In vivo ^{17}O NMR approaches for brain study at high field. *NMR Biomed* 18, 83–103.

Zhu, X.-H., Zhang, Y., Tian, R.-X., Lei, H., Zhang, N., Zhang, X., Merkle, H., Ugurbil, K., Chen, W., 2002. Development of ^{17}O NMR approach for fast imaging of cerebral metabolic rate of oxygen in rat brain at high field. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13194–13199.

ANNEXE

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

SCIENTIFIQUES

Articles

Accepté

Najac, C., Marchadour, C., Guillermier, M., Houitte, D., Slavov, V., Brouillet, E., Hantraye, P., Lebon, V., Valette, J., 2014. Intracellular metabolites in the primate brain are primarily localized in long fibers rather than in cell bodies, as shown by diffusion-weighted magnetic resonance spectroscopy. *NeuroImage* 90, 374-380.

En révision

Najac, C., Branzoli, F., Ronen, I., Valette, J., 2014. Brain intracellular metabolites are freely diffusion along cell fibers in grey and white matters, as measured by diffusion-weighted MR spectroscopy in the human brain at 7 T. Soumis à *Brain Structure and Function*.

Communication orale et posters

Najac, C., Marchadour, C., Guillermier, M., Hantraye, P., Lebon, V., Valette, J., 2012. The major fraction of intracellular metabolites in the primate brain is localized in long fibers rather than in cell bodies, as shown by diffusion-weighted spectroscopy at long and ultra-long diffusion times. *International Society of Magnetic Resonance in Medicine, Melbourne* (présentation n°301). Communication orale.

Najac, C., Marchadour, C., Guillermier, M., Houitte, D., Hantraye, P., Lebon, V., Valette, J., 2013. Neuronal and astrocytic metabolites exhibit different diffusion behavior, as observed by diffusion-weighted spectroscopy at ultra-long diffusion times. *International Society of Magnetic Resonance in Medicine, Salt Lake City* (présentation n°3998). Eposter.

Najac, C., Branzoli, F., Ronen, I., Valette J., 2013. Brain metabolites diffuse « freely » in white and grey matters : new insights into cellular architecture by diffusion-weighted spectroscopy in the Human brain. *International Society of Magnetic Resonance in Medicine, Salt Lake City* (présentation n°3999). Eposter.



Intracellular metabolites in the primate brain are primarily localized in long fibers rather than in cell bodies, as shown by diffusion-weighted magnetic resonance spectroscopy



Chloé Najac^{a,b}, Charlotte Marchadour^{a,b}, Martine Guillermier^{a,b}, Diane Houitte^{a,b}, Velislav Slavov^c, Emmanuel Brouillet^{a,b}, Philippe Hantraye^{a,b}, Vincent Lebon^{a,b}, Julien Valette^{a,b,*}

^a Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), Institut d'Imagerie Biomédicale (I²BM), Molecular Imaging Research Center (MIRcen), 18 route du panorama, BP n°6, F-92265, Fontenay-aux-Roses, France

^b Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Unité de Recherche Associée CEA-CNRS 2210, 18 route du panorama, BP n°6, F-92265, Fontenay-aux-Roses, France

^c Service d'anesthésie réanimation, Hôpital Henri Mondor, 51 avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, 94010 Créteil, France

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 15 December 2013

Available online 29 December 2013

Keywords:

Magnetic resonance spectroscopy

Diffusion

Metabolites

Brain

Monkey

Cell geometry

ABSTRACT

Due to their pure intracellular compartmentation, the translational diffusion of brain metabolites *in vivo* depends on the intracellular environment, including viscosity, molecular crowding and subcellular structures. However, as the diffusion time is increased, metabolites have enough time to significantly encounter cell boundaries, so that cell size and geometry are expected to strongly determine metabolite diffusion path. In the present work, diffusion-weighted nuclear magnetic resonance spectroscopy was used to investigate brain metabolite diffusion *in vivo*, at long and ultra-long diffusion times (from ~80 ms to more than 1 s), in a voxel with equal proportions of white and grey matter in macaque monkeys. No dramatic dependence of the ADC on the diffusion time was observed, suggesting that metabolites' apparent diffusion is largely unrestricted over these time-scales. In an attempt to explain this stability and relate it to plausible cell geometries, data were analyzed with two simple geometrical models describing diffusion either in fibers such as axons, dendrites and astrocytic processes, or in closed cell bodies. Results support the idea that DW-MRS is sensitive to cell shape, and that a vast fraction of brain metabolites is diffusing in long fibers rather than being confined in cell bodies.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Diffusion-weighted (DW) ¹H magnetic resonance spectroscopy (MRS) is a neuroimaging tool to investigate the motion of brain metabolites *in vivo* (see (Nicolay et al., 2001) for review). In contrast to water molecules, which are present everywhere, brain metabolites are confined into the intracellular space and hardly cross biological membranes, so that the interpretation and modeling of metabolite diffusion are much more direct and require less assumptions compared to water diffusion. In addition, some metabolites have a preferential cellular compartmentation, and can therefore be considered as cell-specific endogenous tracers of the intracellular space: N-acetyl-aspartate and glutamate reside essentially in neurons whereas myo-inositol and choline are glial markers whose concentrations increase during astrogliosis, and are preferentially compartmentalized in astrocytes (Choi et al., 2007). In this context, DW-MRS offers the unique perspective of probing the intracellular environment non-invasively under normal and pathological conditions. Changes in endogenous metabolite diffusivity have already been detected in pathologies. Alterations in the diffusion of

metabolites are observed after global ischemia (Abe et al., 2000; Dijkhuizen et al., 1999; Dreher et al., 2001; Van der Toorn et al., 1996; Zheng et al., 2012), in multiple sclerosis (Wood et al., 2012), in brain tumor (Hakumäki et al., 1998; Harada et al., 2002; Valette et al., 2012) or even during neuronal activation (Branzoli et al., 2013) and are often associated to tissue structural damage (Budde and Frank, 2010; Song et al., 2003; Wick et al., 1995). Different approaches to quantitatively evaluate microstructural features such as axonal diameter or axonal angular dispersions using DW-MRI and DW-MRS approaches have been developed (Assaf and Cohen, 1998; Assaf et al., 2008; Ronen et al., 2013). However, the influence of cellular parameters (viscosity, molecular crowding, cell size and geometry...) on DW-MRS measurement remains still unclear and requires further investigation.

The apparent diffusion coefficient (ADC) as measured by DW-MRS is related to the average quadratic displacement $\langle x^2 \rangle$ of molecules within the time during which the displacement is observed (the diffusion time t_d). In the limit of low diffusion-weighting b , where the Gaussian phase distribution approximation holds (Stepisnik, 1999), we have:

$$ADC \approx \frac{\langle x^2 \rangle}{2t_d} \quad (1)$$

* Corresponding author at: CEA Fontenay-aux-Roses, Bâtiment 61, 18 route du panorama, 92 265 Fontenay-aux-Roses cedex, France.
E-mail address: julien.valette@cea.fr (J. Valette).

In vivo, geometrical constraints due to cell membranes and subcellular structures may hinder the translational displacement of metabolites, so that $\langle x^2 \rangle$ may increase less than linearly with time, as opposed to free diffusion. This would result in the ADC decreasing towards an asymptotic value when t_d increases (Tanner and Stejskal, 1968). The time-dependency of the ADC is related to intracellular structures such as organelles but also, as t_d is increased, to long-range geometrical constraints of the intracellular compartment. It can therefore be expected that ADC measured at “long” t_d , where “long” means enough for metabolites to have time to encounter cell walls, may allow the determination of cell shape and size. However, the actual ability of DW-MRS to address these questions remains to be proven. To date, *in vivo* DW-MRS studies have been performed in rodents (Dreher et al., 2001; Hakumäki et al., 1998; Merboldt et al., 1993; Pfeuffer et al., 1998; Valette et al., 2012; Van der Toorn et al., 1996; Wick et al., 1995), monkeys (Valette et al., 2005, 2007) and humans (Ellegood et al., 2005, 2006, 2011; Harada et al., 2002; Kan et al., 2012; Kroenke et al., 2004; Posse et al., 1993; Ronen et al., 2013; Upadhyay et al., 2007, 2008; Zheng et al., 2012) with diffusion times ranging between 13 ms and 240 ms, but always at a single t_d for each study. When combining all published studies, no strong dependence of the ADC on t_d is observed. This is surprising in the context of restricted diffusion, although comparisons between studies are always subject to caution due to inter-species and methodological differences. In contrast, *in vivo* DW-MRS performed at ultra-short t_d (from 1 ms to 13 ms) in rodents demonstrated a significant decrease of brain metabolite ADC as t_d increases, as we have recently reported (Marchadour et al., 2012). In that work, the relative insensitivity of ADC at long t_d and its dependency at ultra-short t_d could be quantitatively explained by two very different, but both biologically relevant cell geometries. The first model consisted in long fibers, representing dendrites, axons and astrocytic processes, isotropically distributed as expected in a large spectroscopic voxel. The second model consisted in large spherical cell bodies filled with organelles. The fact that both models could account for data published in the past (Marchadour et al., 2012), and conversely that no model could be declared superior to the other, suggests that the range of t_d used in the literature was not large enough to assess brain cells shape and size, and appeals to perform measurements at longer t_d to better characterize how DW-MRS can address these questions.

In the present study, diffusion of neuronal and astrocytic metabolites is investigated at long and ultra-long diffusion times in the primate brain, with t_d varying from ~80 ms to more than 1 s. Experiments show that the ADC of all metabolites barely depends on t_d and reaches a non-zero plateau, suggesting that no additional restriction barriers appear over these time-scales, i.e. there are either diffusing in long and narrow fibers, with restriction being free along fibers direction and totally restricted in the transverse directions, or in large cell bodies with distant cell walls. Data are then modeled using analytical models to mimic diffusion either in spherical cell bodies, or in fibers. Results suggest that the cell body model cannot realistically account for the data, and that the ADC stability is characteristic of “unrestricted” diffusion as occurring in the direction parallel to fibers in both neurons (axons, dendrites) and astrocytes (astrocytic processes), while restriction in the two transverse directions is already extremely strong, i.e. the ADC perpendicular to fibers (ADC) is approximately equal to 0 in the range of observed t_d .

Materials and methods

NMR setup

Experiments were performed on a 7 Tesla scanner from Agilent (formerly Varian) equipped with a gradient coil reaching 100 mT/m in 325 μ s along each axis, running with VnmrJ (Palo Alto, CA, USA). A ^1H

quadrature surface coil was used for radiofrequency emission and reception. Anatomical localization was achieved with a scout image. An $18 \times 18 \times 18 \text{ mm}^3$ (5.8 mL) voxel was positioned in the region of interest. Shimming was performed with Fastmap (Gruetter, 1993). Spectra were acquired using a STEAM (Stimulated Echo Acquisition Mode) sequence with echo time TE = 18 ms and repetition time TR = 2800 ms, modified for diffusion-weighting by inserting one diffusion gradient pulse of duration $\delta = 5 \text{ ms}$ during each half of the echo time (e.g. see (Valette et al., 2005)). In a large spectroscopic voxel, the distribution of fiber orientation (in particular white matter fiber bundles) is large and expected to lead to a quasi-isotropic fiber distribution, so that diffusion is expected to be the same along any axis. Therefore, in our study, diffusion gradients were applied along the three axes (x, y, and z) simultaneously, which allowed reaching stronger b . Different diffusion times t_d were obtained by varying the mixing time TM, while keeping b constant by adjusting diffusion gradient strength. Water suppression was performed with an optimized 8-pulses VAPOR scheme (Tkáč et al., 1999). Outer volume suppression was applied to improve localization and avoid extra-voxel contamination.

Cross-term suppression

The brain metabolite ADC can be estimated from the signal attenuation S/S_0 measured when diffusion-weighted gradients G_d are applied relative to reference signal (acquired at $G_d = 0$):

$$\text{ADC} = -\frac{1}{b} \ln \left(\frac{S}{S_0} \right) \quad (2)$$

In the above equation, the diffusion-weighting factor b is defined as:

$$b = \gamma^2 G_d^2 \delta^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3} \right) \quad (3)$$

Here we have $t_d = \Delta - \delta/3$, where Δ is the delay between the two diffusion gradients. In the above equation, it is assumed that cross-terms, i.e. the time-integral of the product of diffusion gradients with other gradients such as crusher, slice-selective and background gradients (i.e. magnetic field inhomogeneities) are all zero. This is generally not the case with STEAM (Tanner, 1970). The cross-terms may become important as t_d is increased (when b is kept constant, i.e. when G_d is decreased while other gradients remain constant) leading to a modified echo decay rate that may severely bias the measurement of ADC at long and ultra-long t_d (Neeman et al., 1990; Zhong et al., 1991). To cancel out cross-terms, DW-spectra can be acquired with positive and negative diffusion gradients for each t_d , the geometric mean over both conditions being then calculated (Jara and Wehrli, 1994; Neeman et al., 1991).

Validity of the approach was assessed *in vitro* using an agarose gel phantom ($c_{\text{agar}} = 3\%$). Water DW-spectra were acquired at $b = 0 \text{ s/mm}^2$ and $b = 1000 \text{ s/mm}^2$ with both gradient polarities using five different mixing times (75, 250, 500, 750, 1000 ms). For each condition, the water signal was simply derived from the area under the water resonance. The ADC was estimated using Eq. (2), taking for S either the signal obtained with positive diffusion gradients, or negative diffusion gradients, or the geometric mean of the signal obtained with both gradient polarities.

In practice, only cross-terms generated by spatially constant gradients such as crusher, slice-selective and constant background gradients are suppressed. Cross-terms generated by spatially varying microscopic background gradients cannot be compensated for by the geometric mean method, and may lead to biased ADC measurement. Therefore, the robustness of the approach to spatially varying gradients was also tested in an agarose gel phantom ($c_{\text{agar}} = 3\%$) containing iron particles ($c_{\text{iron}} = 0.1 \text{ mM}$) to create local micro-inhomogeneities.

In vivo experiments

Experiments were performed on six healthy macaque monkeys (*Macaca fascicularis*, body weight 4–6 kg). Procedures were in accordance with the recommendations of the European Community (86/609) and the French National Committee (87/848). Primary anesthesia was first induced by an i.m. ketamine-xylazine injection (0.7 mL) and maintained by an i.v. infusion of propofol throughout the experiment. Animals were intubated and ventilated with a 55:45 mixture of air and oxygen. The body temperature was maintained at physiological temperature by air heating. Physiological parameters were monitored using an MR compatible Maglife system (Schiller Medical SA, Wissembourg, France). The animal was held in the sphinx position and the head was positioned in a stereotaxic frame with a bite-bar and ear rods. Physiological parameters remained relatively stable within normal range during the experiments: systolic/diastolic pressures were $78 \pm 7/29 \pm 9$ mm Hg, heart/breathing rates were $83 \pm 8/16 \pm 1$ min⁻¹, CO₂ expired pressure was 37 ± 4 mm Hg and temperature was 36 ± 1 °C. The voxel of interest was positioned in the fronto-parietal lobe, including equal proportions of white and grey matters as shown in Fig. 1. Shimming yielded a 13–16 Hz linewidth as measured on the water peak.

Brain metabolite DW-spectra (TR/TE = 2800/18 ms) were acquired at $b = 0$ s/mm² and $b = 3000$ s/mm². It was verified in separate experiments that the logarithm of metabolite signal attenuation was linear in this range of b , proving that we indeed are in the low b -value regime, i.e. the Gaussian phase distribution approximation holds and Eq. (1) is valid (Stepisnik, 1999), and calculating ADC using a single b -value (Eq. (2)) is legitimate. For each animal, spectra were acquired for five different diffusion times ($t_d = 86, 361, 511, 661, 1011$ ms) obtained varying the mixing time between 75 and 1000 ms and resulting in a different gradient strength at each diffusion time ($G_d = 81, 39, 33, 29$ and 24 mT/m respectively). Four different t_d could generally be acquired during each session, resulting in $N = 5$ experiments at $t_d = 86, 361$ and 1011 ms and $N = 4$ experiments at $t_d = 511$ and 661 ms. For each b -value and gradient polarity, 128 transients were collected for the first four t_d values and 256 transients were collected for the longest diffusion time due to a decrease in the signal-to-noise ratio. Water DW-spectra were also acquired for each b -value, gradient polarity and t_d . Since at short TE macromolecule signal contaminates metabolite signal, a macromolecule spectrum was acquired for each experiment and each t_d (except for $t_d = 1011$ ms as macromolecule signal had vanished) using an inversion recovery preparation (TI = 590 ms, 256 repetitions).

Data processing

Post-processing was performed with Matlab (The Mathworks, Natick, MA, USA) and consisted in scan-to-scan phasing, eddy current correction using water reference and macromolecule subtraction. Resulting spectra were then analyzed with LCModel (Provencher, 1993) with a different

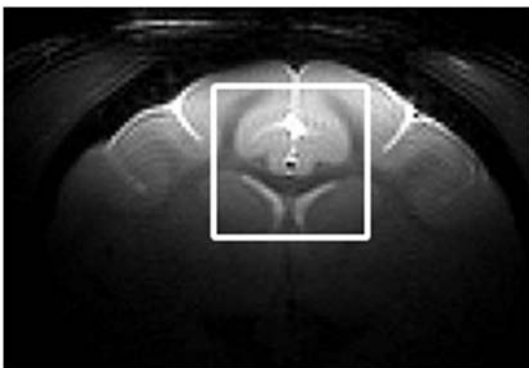


Fig. 1. Position of the 5.8 mL spectroscopy voxel in the fronto-parietal lobe of the macaque brain.

basis-set at each t_d . The basis-set was generated by home-made routines and consisted in total *N*-acetyl aspartate (tNAA including NAA and NAAG), total creatine (tCr including creatine Cr and phosphocreatine PCr), choline compounds (tCho including choline Cho, phosphorylcholine PCho and Glycerophosphorylcholine GPC), glutamate (Glu), myo-inositol (Ins), glutamine (Gln), GABA, lactate (Lac), alanine (Ala), taurine (Tau), glutathione (GSH) and glucose (Glc). Only metabolites with a Cramér-Rao lower bound (CRLB) lower than 5% at all b -values were retained for the analysis: tNAA, tCr, tCho, Glu, Ins. Metabolite ADC was calculated as the logarithm of the geometric mean of the signal obtained with both diffusion gradient polarities, divided by the reference signal.

Diffusion modeling

In vivo, the metabolite signal within our voxel arises from various cellular structures. We considered that neurons consist of a soma (cell body), a long axon and one or more dendrites and that astrocytes are defined by many branching processes radiating from the cell body. Although we recognize the vast heterogeneity and complexity of cell shapes, we propose to use only two simple models to account for the variety of cell geometries: the “neurite” and “cell body” models. Both were implemented on Matlab using the short-gradient-pulse approximation (Balinov et al., 1993; Linse and Söderman, 1995).

- “Neurite” model: In this model, diffusion occurs in impermeable hollow cylinders isotropically distributed in the three dimensions in order to account for diffusion of metabolites in long fibers such as axons, dendrites and astrocytic processes. The signal represents the sum of signals from a large number of differently oriented fibers. For any given fiber, the axis makes a variable angle θ with the diffusion gradient, leading to two diffusion regimes: i) restricted diffusion in the plane perpendicular to their axis resulting in an effective gradient strength $G_{\max} \sin(\theta)$ and ii) free diffusion in the plane parallel to their axis resulting in an effective gradient strength $G_{\max} \cos(\theta)$. When summing over all θ , the ADC decreases from D_{intra} to $D_{\text{intra}}/3$ at long t_d . The rate at which ADC decreases to $D_{\text{intra}}/3$ depends on the fibers diameter d , smaller d resulting in faster decreases.

When gradients are in the direction θ to the axis of the cylinder of radius R , the echo attenuation is given by the following expressions:

$$E(\delta, \Delta, g) = \left\{ \frac{[2 \times J_1(\gamma g_{\perp} \delta R)]^2}{(\gamma g_{\perp} \delta R)^2} + 8 \times (\gamma g_{\perp} \delta R)^2 \times A_{nm} \right\} \times e^{-\gamma^2 \times \delta^2 \times g_{\perp}^2 \times \Delta \times D_{\text{intra}}} \quad (4)$$

with

$$A_{nm} = \sum_{n=0}^{\infty} \left\{ \frac{1}{1 + \delta_{n0}} \times [J'_n(\gamma g_{\perp} \delta R)]^2 \times \sum_{m=1}^{\infty} \frac{\alpha_{nm}^2}{(\alpha_{nm}^2 - n^2) \times [\alpha_{nm}^2 - (\gamma g_{\perp} \delta R)^2]^2} \times e^{-\frac{\alpha_{nm}^2 \times \Delta \times D_{\text{intra}}}{R^2}} \right\}$$

$$g_{\perp} = G_{\max} \times \sin(\theta)$$

$$g_{\parallel} = G_{\max} \times \cos(\theta)$$

In the above equation, J_n is the Bessel function of integer order n and α_{nm} is the m^{th} positive root of the Bessel equation $J'_n = 0$. δ_{n0} is the Kronecker delta symbol.

Two parameters are kept free when fitting data: the intracellular diffusion coefficient D_{intra} and the cylinder diameter d . Note that D_{intra} potentially includes intracellular tortuosity T occurring below the shortest experimental t_d , as caused by organelles for example (i.e. $D_{\text{intra}} = D_{\text{free}}/T^2$, where D_{free} is the free intracellular diffusion).

- “Cell body” model: In this model, diffusion occurs within the soma of neurons and astrocytes modeled by spheres. At long t_d metabolite

diffusion is restricted in all directions; consequently the ADC tends toward 0 at a rate that depends on d .

The echo attenuation in spheres of radius R is given by the following expression:

$$E(\delta, \Delta, g) = \frac{[3 \times j_1(\gamma G_{\max} \delta R)]^2}{(\gamma G_{\max} \delta R)^2} + 6 \times (\gamma G_{\max} \delta R)^2 \times B_{nm} \quad (5)$$

with

$$B_{nm} = \sum_{n=0}^{\infty} \left\{ [j'_n(\gamma G_{\max} \delta R)]^2 \times \sum_{m=1}^{\infty} \frac{(2n+1) \times \alpha_{nm}^2}{(\alpha_{nm}^2 - n^2 - n) \times [\alpha_{nm}^2 - (\gamma G_{\max} \delta R)^2]^2} \times e^{-\frac{\alpha_{nm}^2 \times \Delta \times D_{\text{intra}}}{R^2}} \right\}$$

where $j_n(x)$ is the spherical Bessel function of the first kind and α_{nm} is the m^{th} positive root of the Bessel equation $j'_n = 0$.

The resulting model has two free parameters: the intracellular diffusion coefficient D_{intra} (that again accounts for potential intracellular tortuosity) and the sphere diameter d .

A nonlinear least-square regression was used to estimate the best parameters D_{intra} and d (best fit) that reflect metabolite diffusion in the brain. Error on estimated parameters was evaluated using a Monte-Carlo approach ($N = 1000$ draws). The standard deviation of the experimental data was estimated from the difference between the best fit and the experimental data. Random noise was generated with the same standard deviation and added to the best fit to generate a new dataset, which could be analyzed using the model. When fitting the data, initial condition on the diameter d was randomized between 0 and 50 μm . For the neurite model, the lower bound for D_{intra} was fixed to 2.5 times the minimum metabolite ADC value at our timescale as ADC should decrease from D_{intra} to $\sim D_{\text{intra}}/3$ at long diffusion times. Thus, results are immune to multiple-solution problem.

Results

In vitro validation of cross-term cancellation

ADC measured on spectra acquired with positive diffusion gradients is higher than on spectra acquired with negative gradients. As t_d is increased, ADC acquired with positive gradients is increasing, while ADC with negative gradients is decreasing. When averaging the water signal measured with both gradient polarities, the ADC becomes fairly independent of t_d , around the expected value for water diffusion at 20 °C, for the agarose gel phantom and the agarose gel phantom containing iron particles, as displayed in Fig. 2. This demonstrates that the effect

of cross-terms is cancelled out, which appears to be critical when exploring diffusion for ultra-long t_d . A slight decrease of the mean ADC is observed when adding iron particles to the agarose gel phantom. This may be due to a non-compensation of spatially varying microscopic gradients or the fiber-type micro-organization of the agarose gel phantom. Nevertheless, it represents an extreme situation that is unlikely to occur within *in vivo* experiments. It also ensures that, even in such an extreme situation, the largest source of bias is due to cross-terms with spatially constant gradients (i.e. presumably the other gradients used in STEAM localization scheme), which are compensated for by reversing gradient polarities and taking the geometrical mean of the signal.

Stability of brain metabolite ADC at long t_d

Experiments were then performed *in vivo* in the monkey brain. High quality spectra were obtained even at ultra-long t_d , as shown in Fig. 3. The brain metabolite ADC as a function of t_d , averaged over all experiments, are reported in Table 1 and Fig. 4. Water and brain metabolite ADC exhibited no strong dependency on t_d , although a slight tendency to decrease as t_d is increased may be observed. The values averaged over all experiments and all t_d are: $\text{ADC}_{\text{water}} = 0.61 \pm 0.02 \mu\text{m}^2/\text{ms}$, $\text{ADC}_{\text{tNAA}} = 0.11 \pm 0.01 \mu\text{m}^2/\text{ms}$, $\text{ADC}_{\text{tCr}} = 0.12 \pm 0.01 \mu\text{m}^2/\text{ms}$, $\text{ADC}_{\text{tCho}} = 0.09 \pm 0.01 \mu\text{m}^2/\text{ms}$, $\text{ADC}_{\text{tGlu}} = 0.12 \pm 0.01 \mu\text{m}^2/\text{ms}$, $\text{ADC}_{\text{Ins}} = 0.10 \pm 0.01 \mu\text{m}^2/\text{ms}$.

Modeling the experimental data

Both models were able to fit experimental ADC for all metabolites, as shown in Fig. 4. Values for D_{intra} and d obtained for each brain metabolites with both models are reported in Table 2. For the “neurite” model, best fit yields $D_{\text{intra}} = 0.35 \pm 0.06 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ and $d = 5 \pm 1 \mu\text{m}$ whereas for the “cell body” model, best fit yields $D_{\text{intra}} = 0.13 \pm 0.01 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ and $d = 104 \pm 48 \mu\text{m}$ (mean and s.d. calculated over the five metabolites). As illustrated in Table 3, mean values for D_{intra} and d obtained with Monte Carlo analysis are almost identical to those obtained by best fit (Table 2), except for glutamate where d obtained with the “cell body” model is multiplied by a factor 1.5. Errors were estimated using Monte Carlo analysis. Errors on D_{intra} are very small for both the “neurite” and the “cell body” model ($< 0.02 \mu\text{m}^2/\text{ms}$). Errors on d are also quite small for the “neurite” model whereas they are quite large with the “cell body” model. Because of the large s.d. values obtained for d with the “cell body” model, the cut-off value for the top ninety-fifth percentile ($d_{95\%}$) was also estimated from the Monte Carlo distribution, which gives a lower bound for d with 95% confidence.

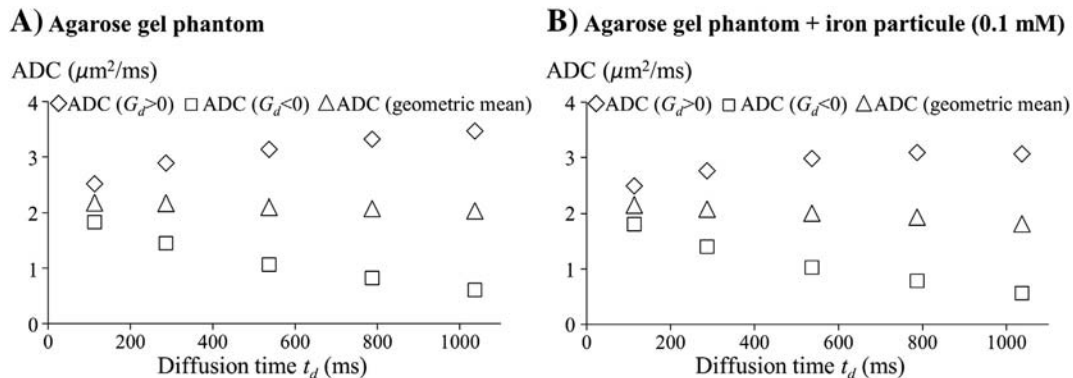


Fig. 2. The effect of cross-terms on water ADC measured in an agarose gel phantom (A) and in an agarose gel phantom containing iron particles (B). In both samples, as t_d is increased, ADC acquired with positive gradients (open diamond) is increasing, while ADC with negative gradients (open square) is decreasing. When averaging the water signal measured with both gradient polarities, the ADC remains stable, independently of t_d (open triangle).

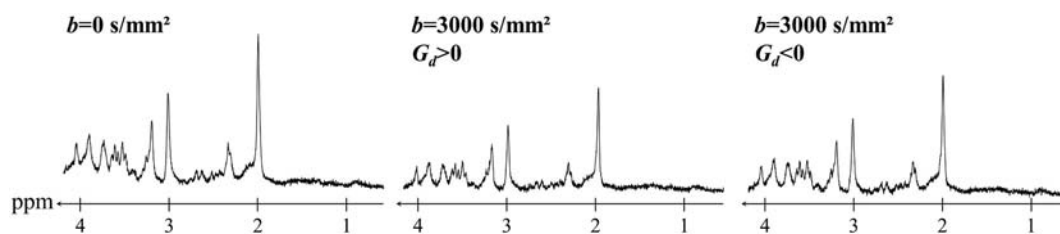


Fig. 3. DW-spectra acquired during a single experiment at $t_d = 1011$ ms with $b = 0$ s/mm², $b = 3000$ s/mm² and $G_d > 0$, and $b = 3000$ s/mm² and $G_d < 0$. As shown here, high quality spectra were obtained even at ultra-long diffusion times.

Discussion

Measurement reliability

For each selected metabolite, Cramér–Rao lower bounds were lower than 5% for reference and diffusion-weighted spectra, demonstrating that accurate quantification of metabolite signal was possible at diffusion times varying from 86 ms to 1011 ms. Accordingly, brain metabolite ADC is highly reproducible among all experiments, as the s.d. is lower than $0.015 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ for each t_d .

In this study, particular attention was paid to minimize bias due to cross-terms. This point proves to be crucial to get a reliable measurement of ADC at all t_d , at least when working at relatively low b -values as it is usually the case on clinical systems. When the signal from experiments with both gradient polarities is used to calculate the geometric mean, the stability of water ADC *in vitro* can be restored, even in the presence of strong local B_0 inhomogeneities. This strongly suggests that the ADC values *in vivo* are also minimally biased by the cross-terms when taking the geometric mean of metabolite signal.

Comparison with past studies performed in the monkey brain (Valette et al., 2005, 2007) reveals no strong differences in ADC values, except for the glutamate and myo-inositol whose ADC was found higher in those former studies. Reasons for this discrepancy are not clear, but may be ascribed to the lower sensitivity and poorer spectral resolution in the former studies, which were performed at 3 T.

“Free” apparent diffusion and cell geometry

As diffusion time is increased, the distance traveled by brain metabolites becomes large enough so that cell size and geometry strongly determine the diffusion path. In our study, we observed no strong dependence of the ADC on the diffusion time for the five selected brain metabolites. The stability of the ADC at a non-zero value suggests that, over the observed time window, observed metabolite diffusion is essentially characteristic of a “free” diffusion component, where “free” means here that no new obstacles appear over observed time-scales. Such “free” diffusion occurs parallel to the axis of long fibers. Fibers have to be sufficiently thin so that restriction perpendicular to fibers would result in ADC ~ 0 at all t_d used in the present study. What “thin” means can be quantitatively appreciated using the fiber models, i.e. fiber diameter must be at most $\sim 5 \mu\text{m}$. Accurate determination of d would actually require going at ultra-short diffusion times to observe

a marked ADC curvature (see (Marchadour et al., 2012)). Still, the “neurite” model explains really well the stability of the metabolite ADC observed up to $t_d = 1$ s. Another possible geometry consists in large cell bodies, where cell walls are sufficiently distant so that restriction is not significant, even at the longest t_d of the study. What “large” means can be quantitatively appreciated using the cell body model, i.e. cell bodies must be at least $\sim 100 \mu\text{m}$. Those values are too large to be realistic except for the largest pyramidal neurons, which can hardly be considered representative of all cells. When we impose more reasonable cell body diameters (e.g. $d = 50, 25$ and $10 \mu\text{m}$) and let D_{intra} free, it clearly appears that the model is not able to account for the stability of the experimental data, as exemplified on tCr on Fig. 5: instead, isotropic restriction in spherical compartments imposes the ADC to significantly decrease within the t_d range of the present study. Therefore, brain metabolite diffusion appears to be typical of diffusion in long fibers rather than large cell bodies. It suggests that, in the spectroscopic voxel consisting in equivalent proportions of grey and white matter, the vast majority of the volume is occupied by axons, dendrites and astrocytic processes. In addition, as brain metabolites are usually considered to be compartmentalized in different cell types (tNAA/Glu in neurons and Ins/tCho preferentially in astrocytes), our results imply that the geometrical properties probed by metabolite diffusion at the time-scales of the present work are not very different between neurons and astrocytes.

It proves difficult to relate our results to estimates of fiber volume fraction from the literature. Indeed, only little quantitative measurements have been performed in the past. The volume fraction of fibers and cell bodies were estimated to be respectively 85% and 15% of the total astrocytic intracellular volume in mouse brain *ex vivo* using 3D confocal morphometry (Chvátal et al., 2007). In other studies, cell body volume fraction for neurons and astrocytes was estimated to be $\sim 15\%$ of total volume (intra and extracellular) in the baboon brain *ex vivo* using Nissle staining (Sherwood and Bassar, 2004), or in the mouse brain using electron micrography (Chklovskii et al., 2002). Considering that extracellular volume fraction represents $\sim 20\%$ of the total volume as usually accepted, this leaves $\sim 65\%$ of the total volume (i.e. $\sim 80\%$ of the total intracellular cellular volume) occupied by fibers. This also corresponds to the neuronal volume fraction of fibers estimated in the fixed baboon brain using diffusion-weighted magnetic resonance imaging with sophisticated modeling (Jespersen et al., 2007). In the end, our observations are consistent with literature reports of fibers representing a vast fraction of the total intracellular cellular volume in the brain in both neurons and astrocytes.

Hitting the limits

The extreme difference in the tCho and Glu compartment diameter as estimated by the cell body model might conceal a difference between metabolites diffusing in astrocytes and in neurons. In the “neurite” model, the fiber length is considered infinitely long, i.e. metabolites experience no restriction due to the neuron and astrocyte endings. However, real fibers extend only over a finite length. In this context, the cell body model may be somehow sensitive to cell limits at the extremity of fibers. Then, the diameter d of the spheres as estimated by the

Table 1

Metabolite ADC measured at five different diffusion times (mean \pm s.d., $N = 5$ experiments at $t_d = 86, 361$ and 1011 ms and $N = 4$ experiments at $t_d = 511$ and 661 ms.).

	ADC ($\mu\text{m}^2/\text{ms}$) $t_d = 86$ ms	ADC ($\mu\text{m}^2/\text{ms}$) $t_d = 361$ ms	ADC ($\mu\text{m}^2/\text{ms}$) $t_d = 511$ ms	ADC ($\mu\text{m}^2/\text{ms}$) $t_d = 661$ ms	ADC ($\mu\text{m}^2/\text{ms}$) $t_d = 1011$ ms
tNAA	0.121 ± 0.009	0.121 ± 0.007	0.121 ± 0.005	0.111 ± 0.007	0.100 ± 0.005
tCr	0.133 ± 0.007	0.118 ± 0.005	0.116 ± 0.009	0.111 ± 0.004	0.111 ± 0.005
tCho	0.104 ± 0.014	0.090 ± 0.007	0.087 ± 0.006	0.084 ± 0.014	0.077 ± 0.012
Glu	0.126 ± 0.009	0.119 ± 0.013	0.127 ± 0.003	0.115 ± 0.005	0.117 ± 0.007
Ins	0.103 ± 0.006	0.097 ± 0.004	0.100 ± 0.004	0.097 ± 0.009	0.082 ± 0.010

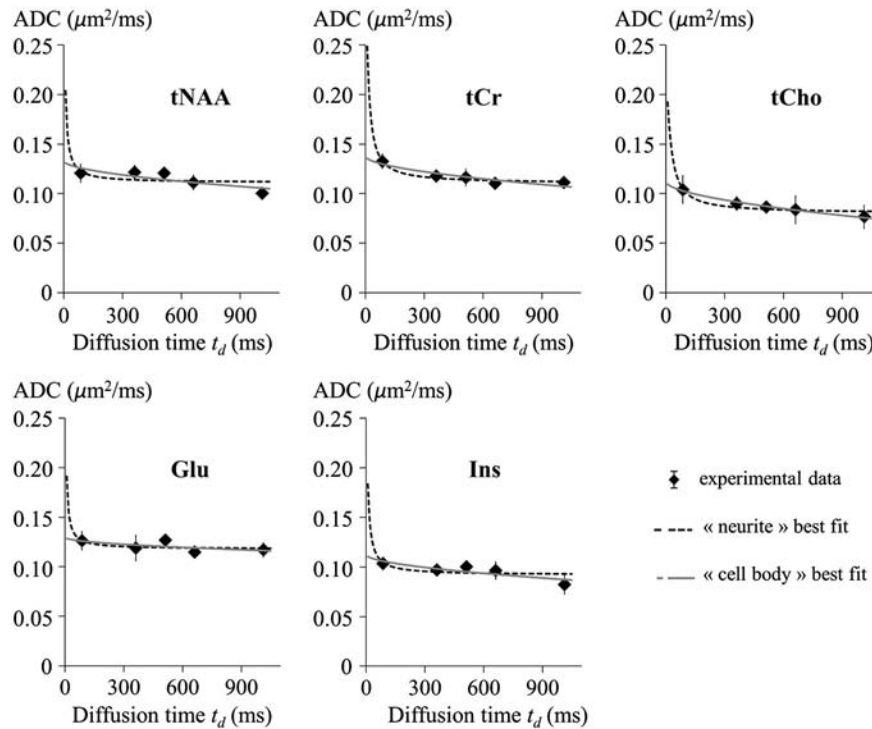


Fig. 4. Brain metabolite ADC was measured at five different diffusion times (86, 361, 511, 661 and 1011 ms) and averaged over the experiments ($N = 5$ experiments at $t_d = 86, 361$ and 1011 ms and $N = 4$ experiments at $t_d = 511$ and 661 ms). No strong dependence of ADC on t_d was observed. The experimental data (black diamond) were fitted with two geometrical models: the “neurite” model (dashed line) and “cell body” model (solid line).

model could be interpreted as a coarse estimate of the length of the fibers in which brain metabolites are diffusing. Interestingly, when ordering metabolites from the smallest to highest d , we get $t\text{Cho} < \text{Ins} < t\text{Cr} < t\text{NAA} < \text{Glu}$ (see Table 2). This is very consistent with the idea that $t\text{Cho}$ and Ins predominantly diffuse in a cellular compartment (the astrocytes) whose processes are shorter than axons and dendrites, in which neuronal $t\text{NAA}$ and Glu are diffusing. The fact that $t\text{Cr}$ lies in-between is also consistent with the idea that $t\text{Cr}$ is not specific to a single cell type. Additional data and adequate models would be required to further study the ability of DW-MRS to distinguish specific long-range geometrical properties in neurons *versus* astrocytes.

Conclusion

In this work, ^1H DW-MRS was performed in the monkey brain at long and ultra-long diffusion times (up to 1 s), in order to assess the potential impact of long-range geometrical restriction on metabolite ADC. It appears that ADC shows no strong dependence on the diffusion time in both neurons and in astrocytes, i.e. it is apparently unrestricted. Modeling of experimental data suggests that metabolites cannot realistically be confined in cell bodies, because the diameter of these cell bodies would have to be too large to account for experimentally observed unrestricted diffusion. In contrast, data are consistent with metabolite

diffusion predominantly occurring in long and thin fibers, such as axons, dendrites and astrocytic processes, rather than in cell bodies. To the best of our knowledge, this is the first experimental evidence that *in vivo* DW-MRS is sensitive to and allows the characterization of cell shape in the brain. One future direction to this work would consist in performing measurements in pure grey and pure white matter voxels (as performed in (Kan et al., 2012)), to assess potential differences in the dependence of metabolite ADC on t_d in both tissues. Another future direction would be to investigate diffusion over a larger range of diffusion times, which would benefit from the use of stronger gradients to reduce minimal t_d , and of higher magnetic field to increase T_1 relaxation time and consequently increase maximal t_d . This could significantly improve data modeling and provide further characterization of metabolite-specific behaviors.

In the end, this work opens new perspectives for interpreting diffusion measurements either in normal or in pathological conditions. For example, since observed diffusion significantly reflects unrestricted diffusion, measured ADC may be sensitive to viscosity and intracellular tortuosity, even at long diffusion times as achievable on clinical scanner. By suggesting that a vast fraction of intracellular molecules diffuses in fibers, this work also strongly supports explanations for water ADC

Table 2

D_{intra} and d obtained with the “neurite” and “cell body” models for the five brain metabolites using the experimental data averaged over all experiments.

	“Neurite” model		“Cell body” model	
	D_{intra} ($\mu\text{m}^2/\text{ms}$)	d (μm)	D_{intra} ($\mu\text{m}^2/\text{ms}$)	d (μm)
tNAA	0.381	4.7	0.134	97
tCr	0.377	6.5	0.138	93
tCho	0.262	6.9	0.113	59
Glu	0.408	4.0	0.130	186
Ins	0.305	4.9	0.113	84

Table 3

D_{intra} and d obtained with Monte Carlo analysis for the five brain metabolites using the experimental data averaged over all experiments (mean \pm s.d., 1000 draws). Because of the large s.d. values obtained with the “cell body” model for d , the cut-off for the top ninety-fifth percentile was also estimated ($d_{95\%}$) from the Monte Carlo distribution.

	“Neurite” model		“Cell body” model		
	D_{intra} ($\mu\text{m}^2/\text{ms}$)	d (μm)	D_{intra} ($\mu\text{m}^2/\text{ms}$)	d (μm)	$d_{95\%}$ (μm)
tNAA	0.380 ± 0.020	4.2 ± 2.3	0.134 ± 0.007	111 ± 59	70
tCr	0.377 ± 0.005	6.5 ± 0.4	0.138 ± 0.004	96 ± 15	76
tCho	0.262 ± 0.008	6.9 ± 0.7	0.113 ± 0.002	59 ± 2	55
Glu	0.408 ± 0.011	3.8 ± 1.5	0.130 ± 0.005	260 ± 203	107
Ins	0.305 ± 0.015	4.7 ± 1.8	0.113 ± 0.006	91 ± 37	62

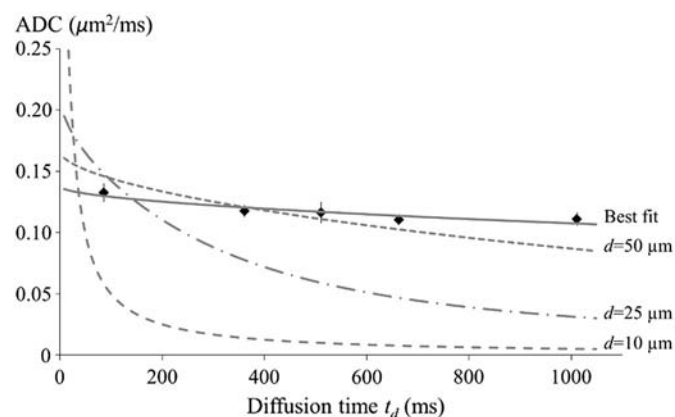


Fig. 5. Modeling of tCr experimental ADC (black diamond) using the cell body model. Best fit (grey line) yields a very large cell diameter $d = 93 \mu\text{m}$. The model cannot account for the fairly stable ADC when imposing more reasonable values for cell diameters, such as $d = 50 \mu\text{m}$ (grey dotted line), $d = 25 \mu\text{m}$ (grey dash-dotted line) and $d = 10 \mu\text{m}$ (grey dashed line).

drop after ischemic stroke based on neurite beading (Budde and Frank, 2010) rather than cell body swelling.

References

- Abe, O., Okubo, T., Hayashi, N., Saito, N., Iriguchi, N., Shirouzu, I., Kojima, Y., Masumoto, T., Ohtomo, K., Sasaki, Y., 2000. Temporal changes of the apparent diffusion coefficients of water and metabolites in rats with hemispheric infarction: experimental study of transhemispheric diaschisis in the contralateral hemisphere at 7 Tesla. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 20, 726–735.
- Assaf, Y., Cohen, Y., 1998. In vivo and in vitro bi-exponential diffusion of N-acetyl aspartate (NAA) in rat brain: a potential structural probe? *NMR Biomed.* 11, 67–74.
- Assaf, Y., Blumenfeld-Katzir, T., Yovel, Y., Basser, P.J., 2008. Axcaliber: a method for measuring axon diameter distribution from diffusion MRI. *Magn. Reson. Med.* 59, 1347–1354.
- Balinov, B., Jonsson, B., Linse, P., Söderman, O., 1993. The NMR self-diffusion method applied to restricted diffusion. Simulation of echo attenuation from molecules in spheres and between planes. *J. Magn. Reson. Series A* 104, 17–25.
- Branzoli, F., Techawiboonwong, A., Kan, H., Webb, A., Ronen, I., 2013. Functional diffusion-weighted magnetic resonance spectroscopy of the human primary visual cortex at 7 T. *Magn. Reson. Med.* 69, 303–309.
- Budde, M.D., Frank, J.A., 2010. Neurite beading is sufficient to decrease the apparent diffusion coefficient after ischemic stroke. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 14472–14477.
- Chklovskii, D.B., Schikorski, T., Stevens, C.F., 2002. Wiring optimization in cortical circuits. *Neuron* 34, 341–347.
- Choi, J.K., Dedeoglu, A., Jenkins, B.G., 2007. Application of MRS to mouse models of neurodegenerative illness. *NMR Biomed.* 20, 216–237.
- Chváta, A., Anděrová, M., Kirchhoff, F., 2007. Three-dimensional confocal morphometry — a new approach for studying dynamic changes in cell morphology in brain slices. *J. Anat.* 210, 671–683.
- Dijkhuizen, R.M., De Graaf, R.A., Tulleken, K.A.F., Nicolay, K., 1999. Changes in the diffusion of water and intracellular metabolites after excitotoxic injury and global ischemia in neonatal rat brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 19, 341–349.
- Dreher, W., Busch, E., Leibfritz, D., 2001. Changes in apparent diffusion coefficients of metabolites in rat brain after middle cerebral artery occlusion measured by proton magnetic resonance spectroscopy. *Magn. Reson. Med.* 45, 383–389.
- Ellegood, J., Hanstock, C.C., Beaulieu, C., 2005. Trace apparent diffusion coefficients of metabolites in human brain using diffusion weighted magnetic resonance spectroscopy. *Magn. Reson. Med.* 53, 1025–1032.
- Ellegood, J., Hanstock, C.C., Beaulieu, C., 2006. Diffusion tensor spectroscopy (DTS) of human brain. *Magn. Reson. Med.* 55, 1–8.
- Ellegood, J., Hanstock, C.C., Beaulieu, C., 2011. Considerations for measuring the fractional anisotropy of metabolites with diffusion tensor spectroscopy. *NMR Biomed.* 24, 270–280.
- Gruetter, R., 1993. Automatic, localized in vivo adjustment of all first- and second-order shim coils. *Magn. Reson. Med.* 29, 804–811.
- Hakumäki, J.M., Poptani, H., Puumalainen, A.-M., Loimas, S., Paljärvi, L.A., Ylä-Herttuala, S., Kauppinen, R.A., 1998. Quantitative ^1H nuclear magnetic resonance diffusion spectroscopy of BT4C rat glioma during thymidine kinase-mediated gene therapy in vivo: identification of apoptotic response. *Cancer Res.* 58, 3791–3799.
- Harada, M., Uno, M., Hong, F., Hisaoka, S., Nishitani, H., Matsuda, T., 2002. Diffusion-weighted in vivo localized proton MR spectroscopy of human cerebral ischemia and tumor. *NMR Biomed.* 15, 69–74.

- Jara, H., Wehrli, F.W., 1994. Determination of background gradients with diffusion MR imaging. *J. Magn. Reson. Imaging* 4, 787–797.
- Jespersen, S.N., Kroenke, C.D., Østergaard, L., Ackermann, J.J., Yablonskiy, D.A., 2007. Modeling dendrite density from magnetic resonance diffusion measurements. *Neuroimage* 34, 1473–1486.
- Kan, H.E., Techawiboonwong, A., van Osch, M.J.P., Versluis, M.J., Deelchand, D.K., Henry, P.G., Marjańska, M., van Buchem, M.A., Webb, A.G., Ronen, I., 2012. Differences in apparent diffusion coefficients of brain metabolites between grey and white matter in the human brain measured at 7 T. *Magn. Reson. Med.* 67, 1203–1209.
- Kroenke, C.D., Ackermann, J.J.H., Yablonskiy, D.A., 2004. On the nature of the NAA diffusion attenuated MR signal in the central nervous system. *Magn. Reson. Med.* 52, 1052–1059.
- Linse, P., Söderman, O., 1995. The validity of the short-gradient-pulse approximation in NMR studies of restricted diffusion. simulations of molecules diffusing between planes, in cylinders and spheres. *J. Magn. Reson. Series A* 116, 77–86.
- Marchadour, C., Brouillet, E., Hantraye, P., Lebon, V., Valette, J., 2012. Anomalous diffusion of brain metabolites evidenced by diffusion-weighted magnetic resonance spectroscopy in vivo. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 32, 2153–2160.
- Merboldt, K.D., Hörstermann, D., Hänicke, W., Bruhn, H., Frahm, J., 1993. Molecular self-diffusion of intracellular metabolites in rat brain in vivo investigated by localized proton NMR diffusion spectroscopy. *Magn. Reson. Med.* 29, 125–129.
- Neeman, M., Freyer, J.P., Sillerud, L.O., 1990. Pulsed-gradient spin-echo diffusion studies in nmr imaging. Effects of the imaging gradients on the determination of diffusion coefficients. *J. Magn. Reson. Series* 1969 (90), 303–312.
- Neeman, M., Freyer, J.P., Sillerud, L.O., 1991. A simple method for obtaining cross-term-free images for diffusion anisotropy studies in NMR microimaging. *Magn. Reson. Med.* 21, 138–143.
- Nicolay, K., Braun, K.P., de Graaf, R.A., Dijkhuizen, R.M., Kruiskamp, M.J., 2001. Diffusion NMR spectroscopy. *NMR Biomed.* 14, 94–111.
- Pfeuffer, J., Flögel, U., Dreher, W., Leibfritz, D., 1998. Restricted diffusion and exchange of intracellular water: theoretical modelling and diffusion time dependence of ^1H NMR measurements on perfused glial cells. *NMR Biomed.* 11, 19–31.
- Posse, S., Cuenod, C.A., Le Bihan, D., 1993. Human brain: proton diffusion MR spectroscopy. *Radiology* 188, 719–725.
- Provencher, S.W., 1993. Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra. *Magn. Reson. Med.* 30, 672–679.
- Ronen, I., Ercan, E., Webb, A., 2013. Axonal and glial microstructural information obtained with diffusion-weighted magnetic resonance spectroscopy at 7 T. *Front. Integr. Neurosci.* <http://dx.doi.org/10.3389/fnint.2013.00013>.
- Sherwood, C.C., Basser, P.J., 2004. Cortical orofacial motor representative in Old World monkeys, great apes, and humans: I. Quantitative analysis of cytoarchitecture. *Brain Behav. Evol.* 63, 61–81.
- Song, S.K., Sun, S.W., Ju, W.K., Lin, S.J., Cross, A.H., Neufeld, A.H., 2003. Diffusion tensor imaging detects and differentiates axon and myelin degeneration in mouse optic nerve after retinal ischemia. *NeuroImage* 20, 1714–1722.
- Stepisnik, J., 1999. Validity limits of Gaussian approximation in cumulant expansion for diffusion attenuation of spin echo. *Physica B* 270, 110–117.
- Tanner, J.E., 1970. Use of the stimulated echo in NMR diffusion studies. *J. Chem. Phys.* 52, 2523–2526.
- Tanner, J.E., Stejskal, E.O., 1968. Restricted self-diffusion of protons in colloidal systems by the pulsed-gradient, spin-echo method. *J. Chem. Phys.* 49, 1768–1777.
- Tkác, I., Starcuk, Z., Choi, I.Y., Gruetter, R., 1999. In vivo ^1H NMR spectroscopy of rat brain at 1 ms echo time. *Magn. Reson. Med.* 41, 649–656.
- Upadhyay, J., Hallock, K., Erb, K., Kim, D.S., Ronen, I., 2007. Diffusion properties of NAA in human corpus callosum as studied with diffusion tensor spectroscopy. *Magn. Reson. Med.* 58, 1045–1053.
- Upadhyay, J., Hallock, K., Ducros, M., Kim, D.S., Ronen, I., 2008. Diffusion tensor spectroscopy and imaging of the arcuate fasciculus. *NeuroImage* 39, 1–9.
- Valette, J., Guillermier, M., Besret, L., Boumezeur, F., Hantraye, P., Lebon, V., 2005. Optimized diffusion-weighted spectroscopy for measuring brain glutamate apparent diffusion coefficient on a whole-body MR system. *NMR Biomed.* 18, 527–533.
- Valette, J., Guillermier, M., Besret, L., Hantraye, P., Bloch, G., Lebon, V., 2007. Isoflurane strongly affects the diffusion of intracellular metabolites, as shown by ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy of the monkey brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 27, 588–596.
- Valette, J., Giraudeau, C., Marchadour, C., Djemai, B., Geffroy, F., Ghaly, M.A., Le Bihan, D., Hantraye, P., Lebon, V., Lethimonnier, F., 2012. A new sequence for single-shot diffusion-weighted NMR spectroscopy by the trace of the diffusion tensor. *Magn. Reson. Med.* 68, 1705–1712.
- Van der Toorn, A., Dijkhuizen, R.M., Tulleken, C.A.F., Nicolay, K., 1996. Diffusion of metabolites in normal and ischemic rat brain measured by localized ^1H MRS. *Magn. Reson. Med.* 36, 914–922.
- Wick, M., Nagatomo, Y., Prielmeier, F., Frahm, J., 1995. Alteration of intracellular metabolite diffusion in rat brain in vivo during ischemia and reperfusion. *Stroke* 26, 1930–1934.
- Wood, E.T., Ronen, I., Techawiboonwong, A., Jones, C.K., Barker, P.B., Calabresi, P., Harrison, D., Reich, D.S., 2012. Investigating axonal damage in multiple sclerosis by diffusion tensor spectroscopy. *J. Neurosci.* 32, 6665–6669.
- Zheng, D.D., Liu, Z.H., Fang, J., Wang, X.Y., Zhang, J., 2012. The effect of age and cerebral ischemia on diffusion-weighted proton MR spectroscopy of the human brain. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 33, 563–568.
- Zhong, J., Kennan, R.P., Gore, J.C., 1991. Effects of susceptibility variations on NMR measurements of diffusion. *J. Magn. Reson.* 95, 267–280 (1969).

The major fraction of intracellular metabolites in the primate brain is localized in long fibers rather than in cell bodies, as shown by diffusion-weighted spectroscopy at long and ultra-long diffusion times

Chloé Najac^{1,2}, Charlotte Marchadour^{1,2}, Martine Guillermier^{1,2}, Philippe Hantraye^{1,2}, Vincent Lebon^{1,2}, and Julien Valette^{1,2}
¹CEA-MIRCen, Fontenay-aux-Roses, France, ²CEA-CNRS URA 2210, Fontenay-aux-Roses, France

Introduction

In vivo ¹H diffusion-weighted NMR spectroscopy (DW-MRS) allows probing the intracellular environment [1]. Due to membrane impermeability to brain metabolites and their pure intracellular compartmentation, metabolite diffusion is expected to be much more restricted than water diffusion. An overview of past studies, carried out for relatively long t_d (from 13 ms [2] to 224 ms [3]) in the rat, monkey and human brains, reveals no strong dependence of the apparent diffusion coefficient ADC on t_d , which is surprising in a context of restricted diffusion, although comparisons between studies are always subject to caution due to inter-species and methodological differences. In contrast, *in vivo* DW-MRS performed at ultra-short t_d (from 1 ms to 13 ms) in rodents showed a strong decrease of brain metabolites ADC as t_d increases [Marchadour *et al.*, this symposium]. In an effort to reconcile these two different behaviors over different time-scales, we decided to explore metabolite diffusion at long and ultra-long t_d . Metabolite ADC in the monkey brain was measured for t_d varying from ~100 ms to ~1 s. No dramatic dependence of the ADC on t_d could be observed over this large time-window, confirming the stability of the ADC suggested by the literature. In an attempt to explain this stability and relate it to plausible cell geometries, two geometrical models were tested to fit the experimental data: a “neurite” model, describing diffusion in long fibers such as axons and dendrites, and a “cell body” model, accounting for diffusion into spherical cell bodies.

Materials and Methods

Experiments: Experiments were performed on a Varian/Agilent primate 7 T system (gradient coil reaching 100 mT/m along each axis in 325 μ s). A ¹H quadrature surface coil was used for RF transmission and reception. A 5.8 mL voxel was positioned as shown in Fig. 1. Shimming was performed with Fastmap (~12 Hz *in vivo*). Spectra were acquired using a modified STEAM sequence (TR/TE=2350/50 ms), for $b=0$ and 5000 s/mm², at different t_d reached by varying mixing time TM. TE=50 ms was chosen to minimize the macromolecule signal while retaining singlet resonances. Since at long t_d cross-terms between diffusion gradients and other gradients may become significant and lead to biased ADC [4], additional DW-spectra were acquired with diffusion gradients of opposite polarity for each t_d [5]. First, water ADC was measured in an agarose gel phantom ($c_{\text{agar}}=3\%$). Then, two *in vivo* experiments were carried out on two healthy macaque monkeys. Primary anesthesia was induced by an i.m. ketamine-xylazine injection (0.7 mL). Anesthesia was maintained by an i.v. propofol infusion. Animals were monitored using a MR-compatible Maglife system. Physiological parameters remained stable within normal range during the experiments. The animals were held in the sphinx position and their head was positioned in a stereotaxic frame. Spectra were acquired for water and metabolites (128 repetitions for each b , gradient polarity and t_d) for $t_d=97, 272, 522, 772, 1022$ ms.

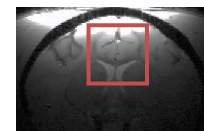


Fig.1: Position of the 5.8 mL voxel in the monkey brain.

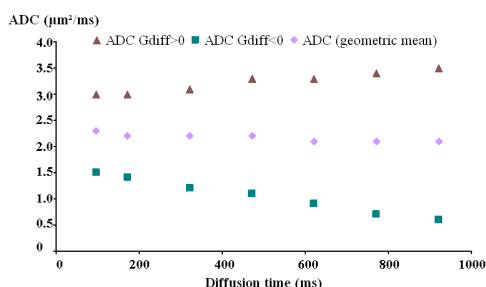


Fig.2: *In vitro* water ADC as a function of t_d for diffusion gradients with positive and negative polarities. It is critical to derive ADC from signal's geometric mean to get stable ADC.

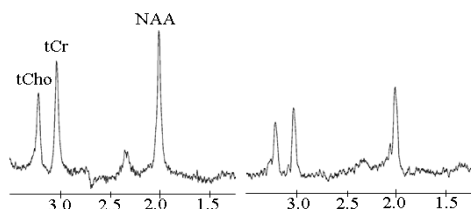


Fig.3: Examples of *in vivo* spectra acquired at $b=0$ and 5000 s/mm² for $t_d=552$ ms.

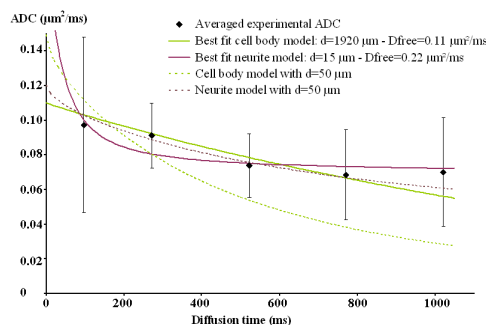


Fig.4: Modeling of metabolite ADC averaged for NAA, tCho and tCr. The cell body model cannot account for the fairly stable ADC with reasonable values for cell diameter.

Processing: Scan-to-scan phasing and eddy current correction using water reference were performed. Spectra were analyzed with LCModel [6] with a different basis-set for each TM. At $b=5000$ s/mm², the geometric mean of the signal measured with both diffusion gradient polarities was calculated. The ADC was finally quantified for water and three brain metabolites: NAA, total creatine (tCr), total Cho (tCho). **Modeling:** The “neurite” and “cell body” models were implemented on Matlab, using Stepisnik’s formalism to calculate the motion spectrum [7], and computing the ADC as the integral of the motion spectrum multiplied by the square of the gradient modulation spectrum for each t_d . In the neurite model, diffusion occurs in hollow cylinders of diameter d isotropically oriented in the 3 dimensions. With this model, the ADC decreases from D_{free} to $D_{\text{free}}/3$ at long t_d (regardless of d) where D_{free} is the intracellular diffusion coefficient. In the cell body model, diffusion occurs within cells modeled by spheres of diameter d , the ADC decreases from D_{free} to 0 at long t_d . D_{free} accounts for potential intracellular tortuosity over short time scales. Fit was performed on the ADC averaged for the three metabolites.

Results and Discussion

Cross-terms suppression: Cross-terms induce an increase of the ADC quantified *in vitro* on spectra acquired with $G_{\text{diff}}>0$ and a decrease of the ADC quantified on spectra acquired with $G_{\text{diff}}<0$. When averaging the water signal measured with both polarities, ADC becomes reasonably stable around the expected water ADC at 20°C (2.03 ± 0.05 $\mu\text{m}^2/\text{ms}$), independently of t_d , as shown in Fig. 2. This demonstrates that the effect of cross-terms is cancelled out, which appears to be critical when exploring diffusion for ultra-long t_d . Note however that cross-terms with spatially varying microscopic gradients would not be compensated for by the geometric mean method.

Metabolites and water diffusion *in vivo*: High quality spectra could be obtained for all t_d , as exemplified on Fig. 3 for $t_d=522$ ms. *In vivo* water and brain metabolites ADC exhibited no strong dependency on t_d ($\text{ADC}_{\text{water}}=0.51\pm0.01$ $\mu\text{m}^2/\text{ms}$, $\text{ADC}_{\text{NAA}}=0.10\pm0.02$ $\mu\text{m}^2/\text{ms}$, $\text{ADC}_{\text{tCr}}=0.08\pm0.01$ $\mu\text{m}^2/\text{ms}$, $\text{ADC}_{\text{tCho}}=0.06\pm0.02$ $\mu\text{m}^2/\text{ms}$). The ADC averaged over the three metabolites is displayed in Fig. 4 as function of t_d . Note that metabolite ADC measured in the past in the rat, monkey and human brain were slightly higher than our values, which may be due to the scan-to-scan phase correction and to the high b -value used here, both resulting in a lower ADC [8].

Diffusion modeling: For the neurite model, best fit yields $D_{\text{free}}=0.22$ $\mu\text{m}^2/\text{ms}$ and $d=15$ μm . Note that, since no strong curvature is observed on data, the model is not accurate on the determination of fiber diameter d , so that larger (e.g. 50 μm , see Fig. 4) and of course smaller d are still consistent with the data. Accurate determination of d would actually require going at ultra-short t_d (~1 ms) to observe ADC’s curvature [Marchadour *et al.*, this symposium]. However, the important point is that the neurite model explains very well the stability observed up to $t_d=1$ s. In contrast, the cell body model yields $D_{\text{free}}=0.11$ $\mu\text{m}^2/\text{ms}$ and $d=1920$ μm , which is a totally unrealistic cell diameter. This is due to the fact that the model has to increase cell diameter to account for ADC stability. When imposing a more realistic cell size, e.g. $d=50$ μm , it appears that the cell body model is not able to account for experimental ADC (Fig. 4). We must conclude that, in contrast with the neurite model, the cell body model is not consistent with current experimental ADC.

Conclusion

In the present work, brain metabolite ADC was measured in the monkey brain at long and ultra-long diffusion times. No strong dependence of the ADC on t_d was observed, consistently with a vast fraction of brain metabolites diffusing in long fibers. This suggests that the volume fraction occupied by neurites and other fibers such as astrocytic processes is very large compared to cell bodies in the brain. This study opens new perspectives for interpreting diffusion measurements, for metabolites but also for water. For example, this work strongly supports explanations for water ADC drop after ischemic stroke based on neurite beading [9].

[1] Nicolay *NMR in Biomed* 2001; [2] Dreher *MRM* 2001; [3] Posse *Radiology* 1993; [4] Tanner *J. Chem. Phys.* 1970; [5] Neeman *MRM* 1991; [6] Provencher *MRM* 1993; [7] Stepisnik *Physica* 1993; [8] Valette *NMR in Biomed* 2005; [9] Budde *PNAS* 2010.

Neuronal and astrocytic metabolites exhibit different diffusion behavior, as observed by diffusion-weighted spectroscopy at ultra-long diffusion times.

Chloé Najac^{1,2}, Charlotte Marchadour^{1,2}, Martine Guillemler^{1,2}, Diane Houitte^{1,2}, Philippe Hantraye^{1,2}, Vincent Lebon^{1,2}, and Julien Valette^{1,2}
¹CEA-MIRCen, Fontenay-aux-Roses, France, ²CEA-CNRS URA 2210, Fontenay-aux-Roses, France

Target audience

This work should be of interest for researchers investigating how diffusion-weighted NMR spectroscopy may be used to characterize brain cell geometry *in vivo*.

Purpose

Diffusion-weighted (DW) NMR spectroscopy offers a unique insight into the intracellular space *in vivo* [1]. The apparent diffusion coefficient (ADC) is related to the average quadratic displacement $\langle x^2 \rangle$ during the diffusion time t_d . *In vivo*, cell membranes and subcellular structures hinder the translational displacement of metabolites. If diffusion time is long enough, the cell geometry is expected to have a significant impact on the ADC [2]. In a previous study carried out in the monkey brain with t_d varying up to 1 s, we observed that metabolites ADC barely depends on t_d suggesting that metabolites diffusion is typical of free diffusion as might occur along long fibers such as axons, dendrites and astrocytic processes [3]. Indeed, in this former study, a model describing diffusion within infinitely long fibers could be used to fit the data. However, real fibers are supposed to extend over a finite length, resulting in some restriction at fibers extremity. Therefore, in an attempt to provide a better characterization of the cellular architecture, we performed new experiments in the monkey brain and investigated metabolites diffusion over a larger time window with t_d varying up to 2 s. The ADC of five brain metabolites diffusing in different compartments (tNAA and Glu in neurons, tCho and Ins in astrocytes and tCr in both neurons and astrocytes) were measured and analyzed. Data were fitted with a model of diffusion within spheres, whose diameters are considered to somehow represent cell dimensions (i.e. fiber length).

Materials and Methods

Experiments: Experiments were performed on a Varian/Agilent 7 T primate system (gradient coil reaching 100 mT/m along each axis in 325 μ s). A ¹H quadrature surface coil was used for RF transmission and reception. A 5.8 mL voxel was positioned in the monkey brain (Fig. 1). Shimming was performed with Fastmap. Water and metabolites DW spectra were acquired using a modified STEAM sequence (TR/TE=2800/18 ms), for $b=0$ and 3000 s/mm², at different t_d reached by varying mixing time TM. Since at long t_d cross-terms between diffusion gradients and other gradients become significant and lead to biased ADC, additional DW-spectra were acquired with diffusion gradients of opposite polarity [3, 4]. Experiments were carried out on healthy anesthetized macaque monkeys. Spectra were acquired for $t_d=82, 357, 507, 657, 1007$ and 2007 ms and with an increased number of averages to keep similar SNR for each t_d . Four or five different t_d could generally be acquired during each session. Since at TE=18 ms, the macromolecules and lipids contaminate the brain metabolite signal, a macromolecule spectrum was acquired for each experiment and each t_d (except for $t_d=1007$ and 2007 ms as macromolecules and lipids signal has vanished) using an inversion recovery preparation (TI=590 ms).

Processing: Scan-to-scan phasing, eddy current correction and macromolecules subtraction were performed. Spectra were analyzed with LCModel [5] with a different basis-set for each TM. The ADC of five metabolites was quantified: total NAA (tNAA), total creatine (tCr), total choline (tCho), glutamate (Glu) and myo-inositol (Ins).

Modeling: A model describing diffusion within cells was implemented on Matlab using Balinov formalism [6]. In this model, cells were modeled by spheres of diameter d and the ADC decreases from D_{intra} towards 0 at long t_d (with D_{intra} the intracellular diffusion coefficient accounting for potential intracellular tortuosity over short time scales). Fit was performed on the ADC of each brain metabolite. Monte Carlo simulations were also performed. Briefly, the standard deviation of the experimental data was estimated from the difference between the best fit and the experimental data. Random noise was generated with the same standard deviation, and added to the best fit to generate a new dataset, which could be analyzed using the model. This procedure was repeated a thousand times for each brain metabolite. Statistics and probability distribution of d could then be estimated.

Results and Discussion

Metabolites diffusion *in vivo*: Good quality spectra were obtained for all t_d , as exemplified in Fig. 2 for $t_d=2007$ ms. Glu and tCho ADC as a function of t_d , averaged over the different experiments, are displayed in Fig. 3. Over this large time-window, a slight decrease of ADC at longer t_d could be observed. Metabolite ADC averaged over all experiments and all t_d were: $ADC_{tNAA}=0.112\pm0.010 \mu\text{m}^2/\text{ms}$, $ADC_{tCr}=0.114\pm0.012 \mu\text{m}^2/\text{ms}$, $ADC_{tCho}=0.086\pm0.011 \mu\text{m}^2/\text{ms}$, $ADC_{Glu}=0.118\pm0.008 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ and $ADC_{Ins}=0.092\pm0.012 \mu\text{m}^2/\text{ms}$.

Diffusion modeling: The model yielded a good fit of the experimental ADC. Best fit values obtained for d were: $d_{Glu}=150 \mu\text{m}$, $d_{tNAA}=116 \mu\text{m}$, $d_{tCr}=96 \mu\text{m}$, $d_{Ins}=79 \mu\text{m}$ and $d_{tCho}=78 \mu\text{m}$. The extreme difference in tCho and Glu cell dimensions might conceal a difference between metabolites diffusing in astrocytes and in neurons. When ordering metabolites from smallest to highest d , we get $tCho < Ins < tCr < tNAA < Glu$. This is consistent with the idea of tCho and Ins diffusing in astrocytes, whose processes are shorter than axons and dendrites in which neuronal tNAA and Glu are diffusing. The fact that tCr lies in between is also consistent with the idea that tCr shows no preferential cell compartmentation.

Monte Carlo simulation: The probability distributions of the cells dimensions are shown on Fig. 4. tCho and Ins distributions completely overlap, which is very consistent with the fact that they are both preferentially compartmentalized in the astrocytes. No overlaps can be observed between tCho and Ins distribution on one side, and Glu distribution on the other side, supporting the idea that Glu diffuses in a distinct compartment (neurons). tNAA and Glu distributions largely overlap, suggesting that they share some common neuronal compartmentalization. tCr distribution overlaps with all metabolites distributions which is consistent with the idea that tCr diffuses in all cells. The overlap between the tNAA and tCho and Ins distributions might reflect measurement uncertainty. Finally, the fact that tCho and Ins compartment size distribution is much narrower than tNAA and Glu distributions suggests that the size of astrocytes might be much more homogeneous than the size of neurons (some having much longer axons and dendrites than others).

Conclusion

In this study, brain metabolite ADC was measured in the monkey brain at ultra-long diffusion times (up to 2 s). Metabolites ADC exhibit a slight decrease with t_d , and modeling suggests that metabolites exhibit different behavior depending on their cellular compartmentation in neurons and astrocytes. Therefore, DW-spectroscopy at ultra-long t_d might allow probing neurons and astrocytes spatial extensions. The model applied here corresponds to a very simplified geometry. A more realistic model consisting in spheres (cell bodies) prolonged by fibers of finite length would certainly allow a better characterization of metabolite-specific behaviors, and a more accurate determination of cell geometrical parameters. To the best of our knowledge, no such analytical model currently exists, but we are going to investigate how numerical models may be used to analyze our data.

[1] Nicolay *NMR in Biomed* 2001 [2] Tanner and Stejskal *J. Chem. Phys.* 1968 [3] Najac *ISMRM* [4] Neeman *MRM* 1991 [5] Provencher *MRM* 1993 [6] Balinov *J. Magn. Reson.* 1993

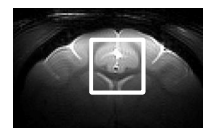


Fig.1: Position of the 5.8 mL voxel in the monkey brain on a T2*-weighted image

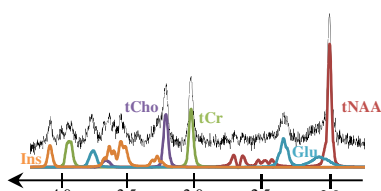


Fig. 2: Example of *in vivo* spectra acquired at $b=3000 \text{ s/mm}^2$ with $t_d=2007 \text{ ms}$, and LCModel analysis.

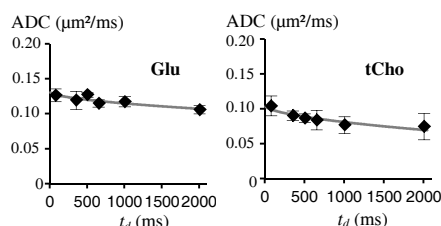


Fig. 3: Metabolites ADC were measured for six t_d . Glu and tCho experimental data (●) and best fit are represented. $N=5$ experiments were averaged at $t_d=82, 357$ and 1007 ms , $N=4$ at $t_d=507$ and 657 ms , $N=3$ at $t_d=2007 \text{ ms}$.

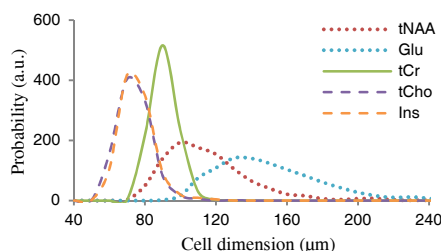


Fig. 4: Histogram of Monte Carlo simulation results. The plots show the probability distribution of the cell dimension for the five brain metabolites.

Brain metabolites diffuse “freely” in white and grey matters: new insights into cellular architecture by diffusion-weighted spectroscopy in the Human brain.

Chloé Najac^{1,2}, Francesca Branzoli³, Itamar Ronen³, and Julien Valette^{1,2}

¹CEA-MIRCen, Fontenay-aux-Roses, France, ²CEA-CNRS URA 2210, Fontenay-aux-Roses, France, ³C. J. Gorter Center for High Field MRI, Department of Radiology, Leiden University Medical Center, Leiden, Netherlands

Target audience

This work should be of interest for researchers investigating how diffusion-weighted NMR spectroscopy may be used to characterize brain cell geometry *in vivo*.

Purpose

Due to the specific intracellular compartmentation of brain metabolites, diffusion-weighted (DW) ¹H NMR spectroscopy is a powerful tool to investigate brain intracellular space *in vivo* [1]. The apparent diffusion coefficient (ADC) is related to the average quadratic displacement $\langle x^2 \rangle$ during the diffusion time t_d . *In vivo*, geometrical constraints due to cell membranes and subcellular structures hinder the translational displacement of metabolites. If diffusion time is long enough, restriction by cell walls is expected to have a significant impact on the ADC [2], with metabolite ADC decreasing towards an asymptotic value which depends on cell geometry. In long and thin fibers isotropically distributed, after an initial fast decrease from D_{intra} to $D_{intra}/3$, metabolite ADC should remain stable around $D_{intra}/3$ (with D_{intra} the intracellular diffusion coefficient). In contrast, it should decrease towards 0 in closed cell bodies. One of our previous study, carried out with t_d varying from 82 ms to 1 s in the monkey brain, revealed that brain metabolite ADC barely depends on t_d , meaning that observed metabolites diffusion essentially reflects unrestricted diffusion, such as occurring in long and thin fibers (axons, dendrites, glial processes...) [3]. Nevertheless, spectra were acquired in a voxel containing equal proportions of white and grey matters, resulting in no tissue specificity. In order to assess potential differences in the dependence of metabolite ADC in both tissues, we decided to explore metabolites diffusion in voxels with various proportions of white matter (WM) and grey matter (GM) in the Human brain, for t_d varying from 100 ms to 720 ms.

Materials and Methods

Experiments: Experiments were performed on a Philips Achieva 7 T MRI scanner (gradient coil reaching 33 mT/m along each axis). A head RF coil (quadrature transmit and 32-channel receive) was used for all measurements. Data were collected from 7 healthy volunteers (age=23±1 years). Two sets of experiments were carried out, either in a 6 mL voxel positioned in parietal white matter, or in a 6 mL voxel positioned in occipital grey matter as shown in **Fig. 1**. Voxels-of-interest (VOI) were selected using a 3D-T1-weighted image. Shimming was performed using a pencil beam method employing second-order shims. Water and metabolites spectra were acquired using a modified DW-STEAM scheme (TE=50 ms, TR=2-3 cardiac cycles (triggering using PPU), pulse duration 24 ms), for $b=0$ and 3000 s/mm², at different t_d reached by varying mixing time (TM=80, 530 and 700 ms). To get rid of tissue anisotropy, the trace of the diffusion tensor was actually acquired, with measurements performed along the three orthogonal directions yielding maximal gradient amplitude ([1 1 -0.5], [-0.5 1 1] and [1 -0.5 1]) [4]. Since at long t_d cross-terms between diffusion gradients and other gradients may lead to biased ADC, additional DW-

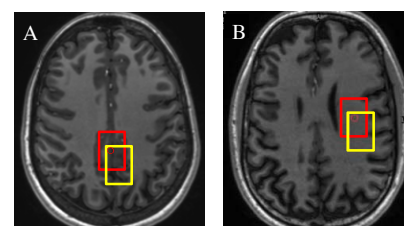


Fig. 1 Position of a 6 mL voxel in occipital grey matter (A) and parietal white matter (B) on 3D-T1-weighted image. Voxels locations are shown for NAA (red box) and water (yellow box)

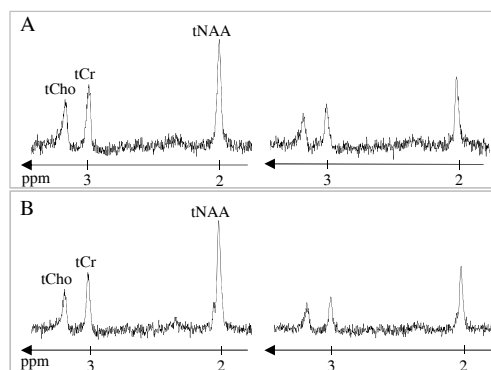


Fig. 2 Examples of *in vivo* spectra acquired at $b=0$ (left) and 3000 s/mm² (right) in one direction for $t_d=720$ ms in GM (A) and WM (B)

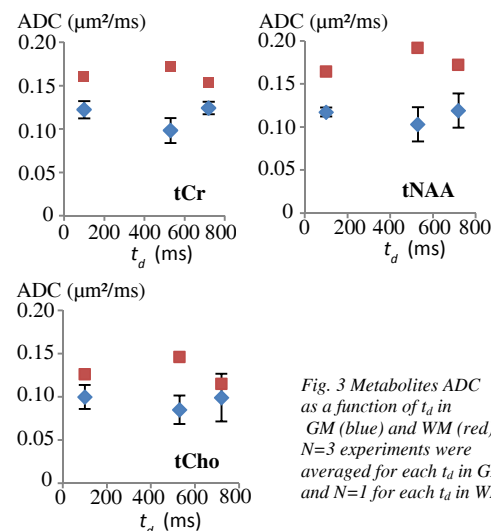


Fig. 3 Metabolites ADC as a function of t_d in GM (blue) and WM (red). $N=3$ experiments were averaged for each t_d in GM and $N=1$ for each t_d in WM.

spectra were acquired with diffusion gradients of opposite polarity for each direction and each t_d [5]. Spectra were acquired with an increased number of averages to keep similar SNR for each t_d .

Processing: Scan-to-scan phasing, frequency drift and eddy current corrections were performed. Spectra were analyzed with LCModel [6] with a different basis-set for each TM. At $b=3000$ s/mm², the geometric mean of the signal measured with both gradients polarities was calculated. The ADC was finally quantified for three brain metabolites: total NAA (tNAA), total creatine (tCr) and choline compounds (tCho). 3D-T1-weighted images were segmented using an in-house routine to determine the proportions of GM, WM and cerebrospinal fluid (CSF) in the VOI.

Results

Parietal voxels predominantly reflected WM (85±7% of WM, 14±7% of GM and 2±1% of CSF), whereas occipital voxels predominantly reflected GM (23±6% of WM, 66±10% of GM and 11±1% of CSF). Good quality spectra could be obtained for all t_d and b values, as exemplified on **Fig. 2** for $t_d=720$ ms. As already reported [7], metabolite ADC was lower in GM ($ADC_{tNAA}=0.108\pm0.005$ μm²/ms, $ADC_{tCr}=0.111\pm0.011$ μm²/ms and $ADC_{tCho}=0.092\pm0.007$ μm²/ms, mean and s.d calculated over all subjects and all t_d) compared to WM ($ADC_{tNAA}=0.176\pm0.014$ μm²/ms, $ADC_{tCr}=0.162\pm0.009$ μm²/ms and $ADC_{tCho}=0.129\pm0.016$ μm²/ms). No time-dependence of metabolite ADC could be observed, either in WM or in GM (**Fig. 3**), meaning that observed diffusion is largely unrestricted for these time-scales.

Discussion and Conclusion

The specific compartmentation of metabolites (tNAA in neurons, tCho mainly in astrocytes, and tCr in all cells) opens a unique insight into the different cellular architectures in WM and GM. Here, no dependence of the ADC on t_d was observed, neither in predominantly WM, nor in predominantly GM voxels. This stability suggests that the major fraction of brain metabolites diffuses in long fibers rather than in cells bodies. For WM, it is relatively well established that neurons are essentially characterized by long, myelinated axons. Even astrocytes in WM have an elongated form. In this context, the stability of metabolites ADC in WM is largely confirmatory of this fiber-like cell structure. In contrast, the fiber-like stability of metabolite ADC in GM goes against the common intuition of neuronal soma occupying a significant volume fraction. Some additional experiments would be required to perform data modeling and derive values about soma diameters and the relative volume fractions between soma and fibers. This study opens new perspectives for interpreting diffusion measurements in the Human brain. The absence of significant restriction suggests that metabolite ADC may be very sensitive to D_{intra} , i.e. to intracellular viscosity, molecular crowding and short distance obstacles (organelle content and intracellular tortuosity), even at relatively long t_d characteristic of clinical scanners. In contrast, variations in cell size may be more difficult to detect within the measurement time-scales of DW-spectroscopy achievable on clinical scanners.

- [1] Nicolay *NMR in Biomed* 2001 [2] Tanner and Stejskal *J. Chem. Phys.* 1968 [3] Najac *ISMRM* 2012 [4] Marchadour *ISMRM* 2012 [5] Neeman *MRM* 1991 [6] Provencher *MRM* 1993 [7] Kan *MRM* 2012.

